



Devenir dans l'atmosphère des virus entériques pathogènes de l'homme présents dans les eaux usées

Guillaume Girardin

► To cite this version:

Guillaume Girardin. Devenir dans l'atmosphère des virus entériques pathogènes de l'homme présents dans les eaux usées. Sciences agricoles. Université d'Avignon, 2015. Français. NNT : 2015AVIG0335 . tel-01269846

HAL Id: tel-01269846

<https://theses.hal.science/tel-01269846>

Submitted on 5 Feb 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Thèse présentée pour l'obtention du grade de
Docteur de l'Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse
en Biologie

par

Guillaume GIRARDIN

Ecole doctorale « AGROSCIENCES & SCIENCES » ED 536

Devenir dans l'atmosphère des virus entériques pathogènes de l'homme présents dans les eaux usées

Présentée et soutenue publiquement le 15/06/2015

Devant le Jury composé de :

Catherine Duport	Pr. Univ. d'Avignon et des Pays de Vaucluse	Président
Christophe Gantzer	Pr. Univ. de Lorraine	Rapporteur
Laurent Huber	DR INRA AgroParisTech	Rapporteur
Alexandre Armengaud	Ingénieur Air PACA	Examineur
Anne Oppliger	PD & MER. Univ. Lausanne	Examineur
Olivier Schlosser	Médecin expert Suez-Environnement	Examineur
Pierre Renault	DR INRA Avignon	Examineur
Dominique Courault	DR INRA Avignon	Directrice de Thèse

À ma mère pour son soutien, ses encouragements et sa patience à toute épreuve,

À la mémoire de mon grand père.

Résumé de la thèse

Réutiliser les eaux usées en irrigation agricole aide à répondre aux besoins croissants en eau, réduit leur décharge dans les eaux conventionnelles et participe à la fertilisation des sols. Les eaux usées d'origine domestique contiennent des virus entériques de l'homme responsables d'épidémies transmises par voies hydrique et alimentaire. Leur transmission aérienne avec maladie à la clé a été mise en évidence dans d'autres contextes, mais il existe peu d'études sur le devenir de virus déposés à la surface du sol ou de végétaux. Aussi cette thèse de Doctorat avait-elle pour objectifs d'évaluer et décrire (i) l'aérosolisation des virus préalablement apportés au sol par irrigation avec des eaux usées et (ii) leur inactivation dans l'atmosphère.

Pour répondre à ces objectifs, des suivis expérimentaux ont été réalisés en conditions semi-contrôlées pour l'aérosolisation (virus déposés *in situ* sur des placettes de sol couvertes par des tunnels) et en conditions contrôlées pour l'inactivation (virus en réacteur atmosphérique de laboratoire). La souche MC0 du mengovirus murin a été utilisée pour l'ensemble des expérimentations. Elle a été multipliée sur des cellules BGM. La teneur en ARN viral a été suivie par RT-qPCR et, pour l'étude de l'inactivation, les virus infectieux ont été simultanément dénombrés par comptage de plages de lyse sur cellules BGM. Ces suivis ont été couplés au suivi des conditions environnementales (rayonnement global, température, humidité relative de l'air, teneur en O₃, auxquels s'ajoutent l'humidité et la température de surface du sol pour l'étude de l'aérosolisation). Ces travaux ont nécessité de concevoir un nouveau réacteur atmosphérique, d'évaluer les performances de biocollecteurs (Impingers et filtres), et d'améliorer le dénombrement des virus infectieux.

Un modèle a été proposé pour décrire l'aérosolisation d'un ou plusieurs pools de virus aérosolisables, chacun étant caractérisé par sa taille et un coefficient cinétique d'aérosolisation. Nous l'avons utilisé pour générer des expériences numériques reproduisant la variabilité des mesures réelles, et pour ajuster à ces expériences numériques des simulations portant soit sur l'aérosolisation cumulée soit sur l'aérosolisation « instantanée ». Les ajustements sur l'aérosolisation instantanée donnent des estimations plus précises du coefficient cinétique d'aérosolisation ; il n'en va pas forcément de même pour l'estimation de la quantité de virus aérosolisables. Un modèle de dépendance du coefficient d'inactivation à l'humidité relative de l'air a été proposé.

Eu égard à l'aérosolisation des virus à partir du sol, les Impingers donnent des aérosolisations estimées plus élevées que les membranes en raison de différences de piégeage et/ou d'extraction. Toutefois, ils ne piègeraient qu'environ 77 % des virus et relargueraient des virus piégés avec un coefficient de réaérosolisation de 0.11. Ces imperfections aboutissent à des estimations des quantités de virus aérosolisés environ 2 fois moins élevées qu'en réalité ; à l'inverse, elles n'affectent pas les estimations des coefficients cinétiques d'aérosolisation. Sans tenir compte de ce biais, entre 1 et 10% des virus apportés ont été aérosolisés. À notre connaissance, c'est la première mise en évidence d'un tel phénomène. On distingue un pool de virus aérosolisés quasi-instantanément (environ 1/3 des virus aérosolisés) d'un pool de virus aérosolisés de manière cinétique. Pour ce dernier pool, la constante cinétique d'aérosolisation varie entre 0.007 et 0.21 h⁻¹ : 90 % des virus du pool cinétique sont aérosolisés au bout de respectivement 13 j et 11 h dans nos conditions. La taille du pool cinétique est bien prédite à partir de la vitesse du vent, de la température de surface du sol et de la nature de l'eau d'irrigation.

A 25°C, l'inactivation est d'autant plus rapide que l'humidité relative de l'air est faible. A cette température, l'estimation du coefficient d'inactivation en fonction de l'humidité relative permet de refléter très approximativement les grandes tendances. Sa valeur maximale, entre 35 et 60 % d'humidité relative, correspondrait à un abattement de 3 log₁₀ en 16 minutes. Cet abattement est amplifié en présence d'un rayonnement composé pour partie d'UV. L'effet de l'O₃ n'a pas été mis en évidence. L'extension des résultats à 15°C nécessiterait une prise en compte explicite d'effets « seuil », et ce probablement pour la stabilité de la capsid qui dépendant des forces de cohésion intermoléculaires

réduites par l'agitation thermique. Les coefficients d'inactivation calculés à partir des données publiées dans la littérature présentent, pour certains virus, le même type de dépendance à l'humidité relative de l'air avec des valeurs maximales toutefois plus faibles. Ils sont spécifiques à chaque virus.

Ce travail pourrait être complété (i) par des travaux sur les méthodes (fonctionnement des Impingers, optimisation des plans d'échantillonnage etc.), (ii) par l'acquisition d'un grand nombre de données pour des contextes variés tant au niveau aérosolisation qu'au niveau inactivation pour aller progressivement vers des connaissances ayant une valeur générique, et par (iii) l'amélioration de la compréhension des processus (pools viraux à définir pour l'aérosolisation, interaction entre rayonnement et chimie de l'atmosphère, déformation de la capsid et force en jeu à l'échelle nanométrique etc.).

Mots clés : eau usée, irrigation, virus entérique, bioaérosol, inactivation, climat, sol

Remerciements

Région



Provence-Alpes-Côte d'Azur



Ce travail a été possible grâce à une demi-bourse de thèse de SUEZ-Environnement et à une demi-bourse de thèse de la Région Provence Alpes Côte d'Azur. Ce travail a été soutenu (fonctionnement, petits équipements ...) par le Pari Scientifique « Devenir des virus pathogènes de l'homme dans l'environnement » du Département INRA *Environnement et Agronomie*, par l'axe « Wastewater Reuse » du projet ANR AgAdapt, par le programme national EC2CO « Evaluation des risques liés aux virus entériques de l'homme émis dans l'atmosphère à proximité des sites de traitement d'eaux usées ou de réutilisation en irrigation », et par le projet ECCOREV du même nom.

Je tiens à exprimer ma reconnaissance aux rapporteurs, **Laurent Huber** et **Christophe Gantzer**, ainsi qu'aux autres membres du Jury ou membres invités, **Anne Oppliger**, **Catherine Duport**, **Alexandre Armengaud**, **Olivier Schlosser**, **Pierre Renault** et **Dominique Courault** pour avoir accepté d'évaluer mes travaux. Je n'oublie pas **Benjamin Loubet** et **Valentina Lazaro**, indisponibles à la date de ma soutenance, pour leurs relectures de mon premier manuscrit.

Je remercie **Liliana Di Pietro**, directrice de l'UMR 1114 EMMAH, Environnement Méditerranéen et Modélisation des Agro-Hydrosystèmes (INRA-UAPV), qui m'a accueilli dans son unité.

Je remercie également ma directrice de thèse, **Dominique Courault**, pour avoir suivi ce travail et pour les stages qu'elle a co-encadrés avec moi en lien avec ma thèse de Doctorat.

Un grand merci à tous les membres de mon comité de thèse : **Fabienne Bon**, **Yves Brunet**, **Philippe Duquenne**, **Soizic Le guyader**, **Olivier Schlosser** et **Henri Wortham**, pour leur soutien et leurs remarques constructives.

Je tiens à remercier très chaleureusement **Pierre Renault** qui a toujours su se rendre disponible pour co-encadrer ces travaux de recherches et accompagner la rédaction, malgré son emploi du temps chargé. Ses connaissances pointues sur les traitements et la réutilisation des eaux usées, son approche globale des techniques de laboratoire, son expertise dans l'analyse statistique et dans la démarche de modélisation m'ont été précieuses. Je lui témoigne toute ma gratitude pour la qualité de son enseignement et de son encadrement dont j'ai pu bénéficier.

Merci à **Fabienne Bon** pour m'avoir accueilli au sein du pôle *Microbiologie Environnementale et Risques Sanitaires* (Université, Dijon), pour m'avoir conseillé et pour avoir complété ma formation à la culture cellulaire. Merci également à **Anne Marie Roque** pour nous avoir fourni la souche virale de l'hépatite A (Hôpital Paul Brousse, Villejuif). Je voudrais aussi remercier **Albert Bosch** et **Cristina**

Fuentes Pardo du Département de Microbiologie (université, Barcelone), ainsi **Sylvie Perelle** et **Audrey Fraisse** de l'unité *Virus Entériques* du *Laboratoire de Sécurité Alimentaire* (ANSES, Maisons-Alfort) pour leur accueil et leur aide lors de la mise au point des protocoles d'infectiosité. Je remercie le *Service de Biochimie et Toxicologie Nucléaire* (CEA Marcoule), notamment **Laurent Bellanger** pour m'y avoir accueilli et **Fabrice Gallais** pour son aide lors de cette troisième année, notamment tous ses conseils qui m'ont permis d'obtenir les résultats escomptés. Je n'oublie pas **Joël Chadoeuf** du Département *Mathématiques et Informatique Appliquées* de l'INRA pour ses conseils et son expertise en statistiques eu égard à l'ajustement de modèles.

Je remercie **Olivier Fannucci**, **Dominique Flura** et **Sophie Genermont** de l'Unité *Environnement et Grande Culture* (INRA, Versailles-Grignon) pour le prêt des tunnels et l'aide à leur montage. Merci à **Etienne Quivet**, **Anne Monod** et **Henri Wortham** de l'équipe *Instrumentation et Réactivité Atmosphérique* (AMU, Marseille), pour leurs conseils, leur soutien et le prêt de matériels.

A tous les membres de l'équipe EMMAH, un grand merci pour la bonne ambiance qu'ils entretiennent, leur soutien et leur contribution. Je remercie plus particulièrement **Line Capowiez** qui m'a aidé à remettre en fonctionnement le laboratoire de microbiologie de l'unité, à instaurer le lien avec le Laboratoire de Biologie Moléculaire, à adapter des protocoles et pour sa participation au traitement des échantillons. Egalement un grand merci à **Franck Tison** et **Bruno Jouaud** pour leur écoute et leurs connaissances techniques pour la construction du dispositif d'inactivation. J'ai toujours pu compter sur eux lors des nombreuses mises aux points. Et bien sur, je n'oublie pas **Dominique Renard** qui a assuré le suivi des variables physiques dans les manip « Tunnels ».

Merci à **Christopher Ball**, **Ousmane Moussa Hane**, et **Camille Krawczyk**, stagiaires que j'ai eu le plaisir de co-encadrer. Grâce à eux, nous avons pu améliorer les dispositifs de collecte et approfondir certains points.

Et très amicales pensées à **Nicolas**, **François**, **Pierre**, **Meriem** et **Virginie** avec qui j'ai partagé le bureau et à tous les autres doctorants du bâtiment. Je n'oublierai jamais ces temps à la pause-café, à la cantine ou en soirée qui ont été l'occasion d'échanges enrichissants et de détente.

Sommaire

RESUME DE LA THESE.....	II
REMERCIEMENTS.....	V
LISTE DES FIGURES.....	II
LISTE DES TABLEAUX.....	IV
LISTE DES ABREVIATIONS.....	V
CHAPITRE I) INTRODUCTION : QUELQUES ELEMENTS DE CONTEXTE	1
CHAPITRE II) SYNTHESE BIBLIOGRAPHIQUE	4
II.1. INTRODUCTION :	4
II.2. RESSOURCES EN EAU ; REUTILISATION DES EAUX USEES ET RISQUES ASSOCIES	5
II.2.a. Eaux conventionnelles ; des problèmes croissants en quantité et qualité	5
II.2.b. Des risques très divers	8
II.2.c. Traitements des eaux usées et effets sur les pathogènes.....	9
II.2.d. L'évaluation quantitative des risques pour la santé	11
II.2.e. Lignes directrices proposées, réglementations et normes :.....	12
II.3. LES VIRUS ENTERIQUES DE L'HOMME PRESENTS DANS LES EAUX USEES	15
II.3.a. Caractères généraux des virus	15
II.3.b. Présence des virus entériques de l'homme dans les eaux et l'air.....	19
II.4. DEVENIR « ATMOSPHERIQUE » DES VIRUS : AEROSOLISATION ET INACTIVATION.....	22
II.4.a. Aérosolisation ou ré-aérosolisation	22
II.4.b. Inactivation dans l'air	23
II.5. CONCLUSION	33
CHAPITRE III) AEROSOLISATION DES VIRUS A PARTIR DU SOL	44
III.1. INTRODUCTION :	45
III.2. MATERIELS ET METHODES	46
III.2.a. Matériels.....	46
III.2.b. Protocoles expérimentaux et plan d'expérience	48
III.2.c. Modélisation des processus, analyse d'incertitude et traitement des données	53
III.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS	59
III.3.a. Incertitudes et biais liés aux métrologies et protocoles expérimentaux	59
III.3.b. Résultats des expérimentations sous tunnels	68
III.4. CONCLUSION	83
CHAPITRE IV) INACTIVATION DANS L'ATMOSPHERE DES VIRUS	89
IV.1. INTRODUCTION	91
IV.2. MATERIELS ET METHODES	95
IV.2.a. Le Virus	95
IV.2.b. Protocoles expérimentaux et plan d'expérience	96
IV.2.c. Modélisation des processus ; traitement des données expérimentales.....	99
IV.2.d. Analyse de jeu de données expérimentales de la littérature :.....	102
IV.3. RESULTATS ET DISCUSSIONS	103
IV.3.a. Niveau initial d'inoculation des tubes ; tests d'homogénéité entre expériences	103
IV.3.b. Evaluation du maintien des nombres de copies génomiques d'ARN viral.....	104
IV.3.c. Inactivation des virus	104
IV.3.d. Analyse des nombres de copies génomiques d'ARN viral.....	109
IV.4. CONCLUSION	111
CHAPITRE V) CONCLUSION ET PERSPECTIVES	117
BIBLIOGRAPHIE GLOBALE.....	121

Liste des figures

Figure II.1	Carte mondiale des zones dont la ressource en eau est menacée.	5
Figure II.2	Types de réutilisation des eaux usées par domaine d'usage.....	6
Figure II.3	Principal site de réutilisation des eaux usées traitées en France.....	7
Figure II.4	Vision schématique du traitement des eaux usées en STEU.....	10
Figure II.5	Structure d'un virus nu.....	15
Figure II.6	Exemple des principales caractéristiques structurales des virus.....	16
Figure II.7	Syncytium observé sur le VHA.....	18
Figure II.8	Shéma du cycle réplcatif des picornavirus.....	19
Figure III.1	Structure du sol des placettes expérimentales	47
Figure III.2	Tunnels ventilés	48
Figure III.3	Dispositif en série de 3 Impingers pour évaluer la réaérosolisation.....	52
Figure III.4	Evolution des concentrations dans la solution de piégeage d'un Impinger.....	54
Figure III.5	Simulation des quantités de virus aérosolisés au cours du temps	56
Figure III.6	Variabilité des des quantités mesururés dans chaque Impinger.....	61
Figure III.7	Distribution des valeurs issues des 100 expériences numériques.....	62
Figure III.8	Trois expériences numériques sous tunnel.....	63
Figure III.9	Estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a suivant les deux options.....	64
Figure III.10	Estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a par les quantités aérosolisées cumulées.....	65
Figure III.11	Modèle d'aérosolisation avec 3 pools viraux.....	66
Figure III.12	Exemple de suivi sous tunnel	69
Figure III.13	Mesures de la concentration des suspensions virales pour chaque tunnel.....	71
Figure III.14	Comparaison des quantités de virus aérosolisés entre filtres et impingers.....	73
Figure III.15	Flux instantané de virus aérosolisés au cours du temps.....	76
Figure III.16	Quantités cumulées de virus aérosolisés au cours du temps.....	77
Figure III.17	Corrélation entre quantité totale de virus aérosolisés sur 30 min et 56 h.....	73
Figure III.18	Plage d'estimation du cumul de virus aérosolisés.....	75
Figure III.19	Ajustements divers en prévision d'un modèle.....	79
Figure III.20	Relation entre émissions observées et des émissions simulées	80
Figure III.21	Quantités cumulées observées et simulées de virus aérosolisés	82
Figure IV.1	Données météorologiques pour Avignon	92
Figure IV.2	Réacteur conçu pour suivre l'inactivation des virus	96
Figure IV.3	Schema du dispositif d'inactivation.....	97
Figure IV.4	Comparaison de l'intensité moyenne de la lampe et le rayonnement solaire...	98

Figure IV.5	Exemples de dépendance du rapport k_i/α à l'humidité relative.....	101
Figure IV.6	Evolutions simulées de l'humidité relative dans le réacteur atmosphérique pour une valeur initiale de 30% et des valeurs visées de 30, 50 et 80%.....	101
Figure IV.7	Evolutions simulées de l'humidité relative dans le réacteur atmosphérique pour une valeur initiale de 30% et pour une visée de 30%, à 15, 25 et 40°C ..	102
Figure IV.8	Mesure des quantités de virus totaux et infectieux dans les témoins.....	103
Figure IV.9	Quantité de virus totaux au cours du temps pour chaque expérience.....	105
Figure IV.10	Quantité de virus infectieux au cours du temps pour chaque expérience.....	106
Figure IV.11	Ajustement des PFU simulés aux PFU expérimentaux.....	107
Figure IV.12	Fonction $K_i(HR)$ pour les ajustements	108
Figure IV.13	Evolutions simulée et mesurée du nombre de virus infectieux.....	108
Figure IV.14	Coefficients d'inactivation estimés à partir de la littérature.....	110

Liste des tableaux

Tableau II.1	Synthèse des mesures réglementaires françaises relatives aux analyses et à l'utilisation des eaux usées en irrigation.....	14
Tableau II.2	Principaux virus pathogènes de l'homme et bactériophages rencontrés dans les eaux usées.....	19
Tableau II.3	Concentration retrouvée dans les eaux usées brut pour les principaux virus enterique.....	21
Tableau II.4	Synthèse des conditions expérimentales testées avec des virus entérique en réacteur ouvert.....	27
Tableau II.5	Synthèse des conditions expérimentales testées avec des virus entérique en réacteur fermé.....	28
Tableau II.6	Synthèse des conditions expérimentales testées avec des virus entérique sur support	30
Tableau III.1	Caractéristiques des 7 expériences menées sous tunnel ventilé	51
Tableau III.2	Rapport entre concentration finale et initiale dans le 1 ^{er} des 3 Impingers....	59
Tableau III.3	Rapport à plusieurs dates entre concentration dans les Impingers 3 et 2.....	60
Tableau III.4	Estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a	65
Tableau III.5	Définition de 3 pools de virus suivant leur niveau d'attachement au sol.....	66
Tableau III.6	Paramètres estimés par simulation numérique pour 2 ou 3 pool de virus....	67
Tableau III.7	Valeurs expérimentales cumulées sur 54 à 56 h et initiales sur 30 min.....	74
Tableau IV.1	Caractéristiques des expériences menées en réacteur atmosphérique.....	99

Liste des abréviations

ADN	Acide désoxyribonucléique
ARN	acide ribonucléique
ARNss(+)	Acide ribonucléique simple brin positif
BBQ	BlackBerry® Quencher
BGM	« Buffalo Green Monkey »
Ct	Cycle Threshold
CCL3	Contaminant Candidate List
dNTP	Mélange des quatre désoxyribonucléotides
EUT	Eaux usées traitées
FAM	6 carboxy-fluorescein
FRhK-4	Cellule de rein de singe (Macaque rhésus)
FRET	« Förster resonance energy transfer »
gc	« Genome Copy »
HeLa	Lignée cellulaire cancéreuse d'origine humaine (Henrietta Lacks)
HR	Humidité relative
ICTV	International Committee for the taxonomy of viruses
MVM	Mengovirus murin
PBS	Tampon phosphate salin (pH=7,4, [KH ₂ PO ₄]=11,9mM, [NaCl]=137mM, [KCl]=2,7 mM)
PFU	Plaque-Forming Unit
PSM :	Poste de sécurité microbiologique
PTFE	polytétrafluoroéthylène
QMRA	Quantitative Microbial Risk Assessment
Qva	Quantité de virus aérosolisés
RT-qPCR	« Reverse transcriptase polymerase chain reaction quantitative »
STEU	Station de traitement des eaux usées
SVF	Sérum de veau fœtal
UV	Ultraviolet
UFC	Unité Formant Colonie
VHA	virus de l'hépatite A
VHE	Virus de l'hépatite E

Chapitre I) Introduction : quelques éléments de contexte

A l'échelle planétaire, on assiste aujourd'hui à des problèmes croissants de ressources en eau, incluant des problèmes de quantité et des problèmes de qualité (WHO, 2006). Les problèmes de quantité résultent d'un accroissement de la population mondiale, de l'urbanisation croissante des populations (Kennedy et al., 2012), du changement climatique planétaire, et de la diversification des usages de l'eau avec notamment le développement d'usages récréatifs et d'usages environnementaux. La dégradation de la qualité des ressources en eau conventionnelle résulte pour partie d'une surexploitation des aquifères "côtiers" entraînant leur salinisation (Brissaud, 2003), et pour partie du retour d'eaux usées non ou partiellement traitées dans les cours d'eau ou les aquifères entraînant leur contamination par des composés chimiques très variés et des agents pathogènes de l'homme (Van den Bruggen, 2010). Plusieurs solutions ont déjà été mises en œuvre pour pallier aux manques de ressource en eau conventionnelle : le transport d'eau sur de grandes distances, la désalinisation d'eau de mer ou d'eau saumâtre, et la réutilisation d'eaux usées à diverses fins (alimentation en eau potable, usages industriels, usages urbains variés, irrigation agricole ...). La réutilisation des eaux usées en irrigation agricole est une pratique déjà largement répandue dans certains pays (Renault, 2014). Au-delà du fait de valoriser cette ressource marginale, la réutilisation réduit la contamination des rivières ou des aquifères par les rejets directs d'eaux usées ; elle peut simultanément amener des fertilisants aux cultures (N et P essentiellement). Toutefois, l'irrigation des cultures par les eaux usées peut être à l'origine de risques pour les productions agricoles, pour l'environnement et pour la santé humaine ; il convient d'analyser ce risque dans un cadre systémique de gestion des ressources en eau en comparant des scénarios avec et sans recyclage d'eaux usées pour l'irrigation agricole. Ce travail nécessite une bonne connaissance du devenir environnemental des contaminants que les eaux usées contiennent. Pour des eaux usées d'origine domestique, les risques chimiques (éléments traces métalliques, substances organiques émergentes, autres composés parfois fortement présents (Na^+ , Cl^- , borate ...)) semblent secondaires au regard des risques sanitaires liés à la présence de pathogènes de l'homme dans ces eaux. On distingue parmi les pathogènes des helminthes, des protozoaires, des bactéries et des virus (Hoffman et al., 2009 ; Sidhu et Toze, 2009), auxquels il faudrait ajouter certaines algues parfois classées parmi les contaminants chimiques en raison du danger qui résulte des neurotoxines, hépatotoxines et microcystines qu'elles produisent. Il est nécessaire d'avoir accès à une évaluation des risques sanitaires pour l'homme associés à la transmission de pathogènes par différentes voies (aliments, eau, air) ; implicitement, l'évaluation des risques passe par une description du devenir des pathogènes dans l'environnement.

Avec le développement de méthodes de détection et de dénombrement de virus aux teneurs environnementales, la transmission des virus entériques est de plus en plus souvent incriminée dans les épidémies d'origines alimentaire et hydrique de l'homme. Aux Etats-Unis par exemple, 8% des épidémies d'origine hydrique recensées entre 1971 et 2002 avaient une origine virale avérée mais, au-delà, 47% des épidémies étaient des gastroentériques aiguës d'origine non identifiée mais dont l'étiologie était compatible avec des infections d'origine virale (Reynolds, 2008). Parmi les épidémies alimentaires dont l'origine virale est avérée, il y a certes des épidémies liées à la consommation de fruits de mer, mais aussi des épidémies associées à la consommation de produits végétaux : tomates semi-séchées, myrtilles, oignons à salade, fraises congelées, framboises fraîches ou congelées à titre d'exemples (Cook et D'Agostino, 2013). Les principaux virus incriminés dans les épidémies sont les calicivirus (norovirus), les entérovirus (poliovirus, coxsackievirus, echovirus), les rotavirus, les adénovirus, et le virus de l'hépatite A. D'autres virus sont parfois détectés : virus de l'hépatite E,

sapovirus, reovirus La commission du Codex Alimentarius a reconnu en 2012 que les virus entériques humains les plus fréquemment mentionnés comme responsables d'épidémies d'origine alimentaire sont les norovirus et le virus de l'hépatite A (CAC/GL 79-2012). Toutefois si l'hépatite A est endémique en Afrique du Nord et dans quelques pays Européens comme l'Albanie, elle est présente en moindre proportion dans quelques autres pays Européens comme la Grèce, l'Espagne et l'Italie, et presque absente dans d'autres pays Européens comme la France où elle résulte alors souvent d'échanges internationaux de personnes (Hanafiah et al., 2011). Certains de ces virus sont retrouvés systématiquement dans les eaux usées brutes arrivant aux stations d'épuration des eaux usées (STEU), leur abattement étant toujours inférieur à 2 log lorsque les traitements s'arrêtent après un traitement secondaire de type « boue activée » (WHO, 2006) ; l'abattement est augmenté par la présence de traitements tertiaires, mais très dépendant du traitement (Lazarova, 2004).

Le devenir environnemental des virus peut combiner transport, immobilisation/mobilisation et inactivation (i.e. la perte de leur caractère infectieux). Plusieurs études ont traité de l'immobilisation de virus à la surface de solides (plans de travail dans l'alimentaire, surfaces susceptibles de contamination manuelles, feuilles de végétaux et particules de sol) (Deboosere et al., 2012). L'inactivation des virus a été étudiée pour des conditions très éloignées des conditions environnementales (notamment dans le domaine de l'agro-alimentaire, et pour les procédés de purification/stérilisation) comme pour certaines conditions environnementales. Pour les études dans des contextes environnementaux, les virus étaient très souvent en suspension dans l'eau ou immobilisés à la surface de solides (Kim et al., 2012 ; Fujioka et Yoneyama, 2002). Les virus entériques de l'homme sont généralement très résistants dans les environnements aqueux liquides. Lorsqu'il ne s'agit pas d'une destruction totale, l'inactivation peut résulter d'une altération de leur matériel génétique et/ou d'une altération de leur capsid, notamment des récepteurs de reconnaissance permettant l'infection des cellules cibles. Quelques études ont montré qu'il peut y avoir internalisation de virus dans certains végétaux à partir de leurs racines, puis transfert vers les parties consommées crues sans perte de pouvoir infectieux, mais ces études restent trop peu nombreuses pour pouvoir généraliser leurs résultats (DiCaprio et al., 2015).

Peu d'études ont traité du devenir des virus entériques de l'homme dans l'atmosphère. En environnement intérieur, des contaminations par voie aérienne avec symptômes à la clé ont été clairement démontrées au restaurant (Marks et al., 2000), à école (Marks et al., 2003) et en hôpital (Nenonen et al., 2014). *In situ*, la présence de virus entériques de l'homme dans l'air a été notée au voisinage des stations de traitement des eaux usées (Masclaux et al., 2014). Elles montrent que la transmission par voie aérienne de virus entériques de l'homme doit être envisagée lorsqu'il y a irrigation par des eaux usées. En contraste et à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la possibilité d'une remise en suspension dans l'atmosphère de pathogènes préalablement déposés au sol ou à la surface de végétaux avec l'eau d'irrigation. Les connaissances sur l'inactivation des virus dans l'air reposent sur un nombre limité d'études avec des virus aérosolisés dans des réacteurs ouverts ou fermés, ou avec des virus déposés sur des supports variés. Les acquis restent très partiels en raison des limites des méthodologies employées, de la diversité des réponses entre virus, et de l'absence de données sur plusieurs virus ; ces acquis concernent notamment l'effet de l'humidité relative et température de l'air.

Ainsi, cette Thèse de Doctorat avait comme objectifs généraux :

- l'évaluation des possibilités de remises en suspension dans l'atmosphère de virus préalablement apportés au sol par l'irrigation : fraction des virus apportés aérosolisés, impact du contexte (vent, humidité et température de surface du sol, composition chimique de l'apport ...) ;
- l'évaluation du niveau d'inactivation des virus dans l'atmosphère avec plus spécifiquement l'effet de l'humidité relative et de la température de l'air, l'effet du rayonnement et l'effet de la teneur en O₃.

Le travail a porté sur le mengovirus murin, comme modèle de picornavirus (virus de l'hépatite A...) (Sano et al., 2015 ; Costafreda et al., 2006 ; Pinto et al., 2009).

Chapitre II) Synthèse bibliographique

Réutilisation des eaux usées en irrigation agricole et risques sanitaires dus à la présence de virus entériques

II.1.	INTRODUCTION :	4
II.2.	RESSOURCES EN EAU ; REUTILISATION DES EAUX USEES ET RISQUES ASSOCIES.....	5
II.2.a.	<i>Eaux conventionnelles ; des problèmes croissant en quantité et qualité</i>	5
II.2.b.	<i>Des risques très divers</i>	8
II.2.c.	<i>Traitements des eaux usées et effets sur les pathogènes</i>	9
II.2.d.	<i>L'évaluation quantitative des risques pour la santé.....</i>	11
II.2.e.	<i>Lignes directrices proposées, réglementations et normes :</i>	12
II.3.	LES VIRUS ENTERIQUES DE L'HOMME PRESENTS DANS LES EAUX USEES	15
II.3.a.	<i>Caractères généraux des virus.....</i>	15
II.3.b.	<i>Présence des virus entériques de l'homme dans les eaux et l'air</i>	19
II.4.	DEVENIR "ATMOSPHERIQUE" DES VIRUS : AEROSOLISATION ET INACTIVATION	22
II.4.a.	<i>Aérosolisation ou ré-aérosolisation.....</i>	22
II.4.b.	<i>Inactivation dans l'air</i>	23
II.5.	CONCLUSION	33

II.1. Introduction :

A l'échelle planétaire, on assiste à des problèmes croissants de ressources en eau, en quantité et en qualité (Renault et al., 2014 ; Van der Bruggen, 2010). Ces problèmes résultent de l'accroissement de la population mondiale et de l'urbanisation (Qadir et al., 2010 ; Kennedy et al., 2012), du changement climatique planétaire (Bates et al., 2008 ; Bixio et al., 2006), de la diversification des usages de l'eau (Asano, 1998), de la surexploitation d'aquifères (Taylor et al., 2012 ; Giungato et al., 2010), et du déversement d'eaux usées insuffisamment traitées dans les eaux conventionnelles (Van der Bruggen, 2010). Déjà pratiquée dans certains pays (Renault et al., 2014 ; Bixio et al., 2008), la réutilisation d'eaux usées en irrigation permet d'exploiter cette ressource marginale, limite leur rejet dans l'environnement, et contribue à fertiliser les cultures (N, P ...) (Jiménez et al., 2010 ; Keraita et al., 2008 ; Ensink and van der Hoek, 2006). Elle présente toutefois des risques pour les productions agricoles, l'environnement et la santé (Renault et al., 2014 ; Van der Bruggen, 2010). Eu égard à la santé, les risques chimiques semblent secondaires au regard des risques microbiologiques pour les eaux usées d'origine domestique (Renault et al., 2014 ; Van der Bruggen, 2010). Les eaux usées brutes contiennent divers pathogènes, dont des virus entériques de l'homme (Pachepsky et al., 2011). Certains y sont systématiquement détectés, et leur abattement en station d'épuration est généralement faible en absence de traitement tertiaire adapté (La Rosa et al., 2010 ; Van den Berg et al., 2005). Ils sont de plus en plus souvent incriminés dans les épidémies d'origines hydrique (WHO, 2006 ; Reynolds, 2008 ; Craun et al., 2010) et alimentaire (Cook et D'Agostino, 2013). Les principaux virus incriminés sont les norovirus, les enterovirus (poliovirus, coxsackievirus, echovirus), les rotavirus, les adenovirus, et le virus de l'hépatite A (Rodríguez-Lázaro et al., 2012) ; et la commission du Codex Alimentarius a reconnu en 2012 que les virus entériques humains les plus fréquemment mentionnés comme responsables d'épidémies d'origine alimentaire sont les norovirus et le virus de l'hépatite A (CAC/GL 79-2012).

II.2. Ressources en eau ; réutilisation des eaux usées et risques associés

II.2.a. Eaux conventionnelles ; des problèmes croissants en quantité et qualité

Le monde est confronté à des problèmes croissants de limitations des ressources en eau qui résultent de l'accroissement des populations ([Qadir et al., 2010](#)), de l'urbanisation croissante ([Kennedy et al., 2012](#)), du réchauffement global de la planète ([IPCC, 2013](#)), et de la diversification des usages de l'eau ([Asano, 1998](#)). Certains pays présentent des indices de stress hydriques élevés ([Bixio et al., 2006](#)). A ces problèmes s'ajoutent une dégradation de la qualité des ressources en eaux conventionnelles. On observe une salinisation croissante des aquifères littoraux liée à leur surexploitation ([Taylor et al., 2012](#) ; [Giungato et al., 2010](#)), et une contamination des ressources en eaux conventionnelles due au déversement d'eaux usées non ou insuffisamment traitées ([Van der Bruggen, 2010](#)). Des tensions et des conflits existent pour l'accès aux ressources en eau dans certaines régions ([Brown et Matlock, 2011](#) ; [Paquerot, 2007](#)). Selon [Vörösmarty et al. \(2010\)](#), 80% de la population mondiale est exposée à des niveaux élevés de menace par rapport à la ressource en eau (Figure II.1).

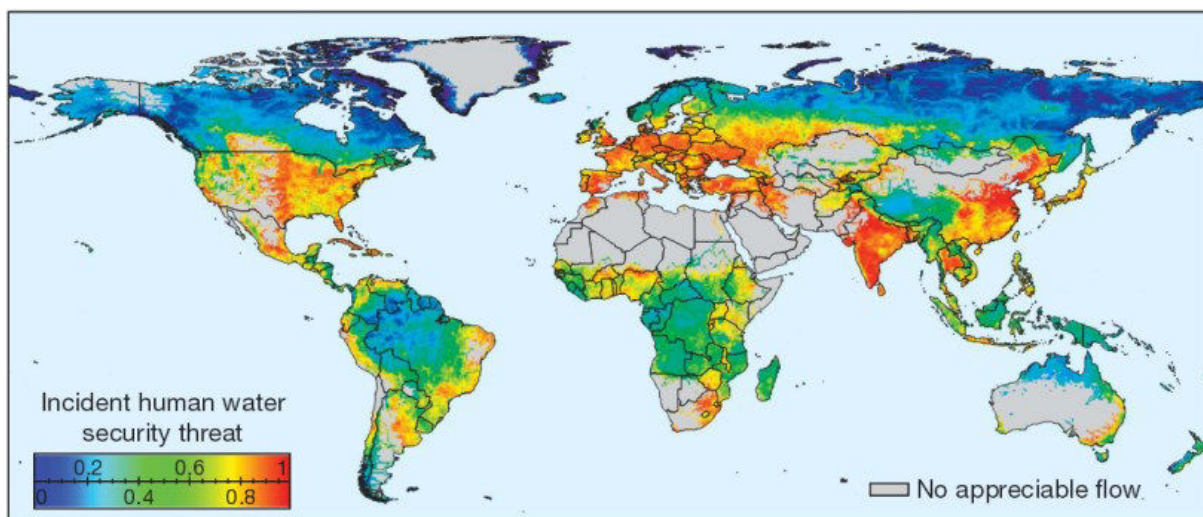


Figure II.1 : Carte mondiale des zones dont la ressource en eau est menacée dans le futur, d'après [Vörösmarty et al. \(2010\)](#).

On estime que l'activité humaine prélève chaque année environ 3800 milliards de m³ d'eau, dont 70 % sont utilisés pour l'irrigation, 22 % pour l'industrie et 8 % pour les usages domestiques ([AFD, 2011](#)). Le recyclage des eaux usées peut permettre de faire face simultanément aux problèmes d'eau en quantité et en qualité ([Bixio et al., 2008](#)). Il est déjà pratiqué notamment en irrigation (agricole, de parcs, d'aires de sport, de surfaces boisées) ([Angelakis et Durham, 2008](#)), à des fins industrielles ([Van der Bruggen, 2010](#)), voire pour la redistribution en eau potable ([Du Pisani, 2006](#) ; [Leverenz et al., 2011](#)). Toutefois à l'échelle mondiale, la réutilisation des eaux usées concerne moins de 4 % de ces eaux et permet d'entrevoir une intensification de cette pratique ([AFD, 2011](#)).

Le recyclage des eaux usées est très variable entre pays, en termes de proportions d'eaux réutilisées, de traitements préalables, d'usages et de réglementations associées ([FAO et OAA, 2011](#) ; [Bixio et al., 2008](#)) comme illustré par la Figure II.2.

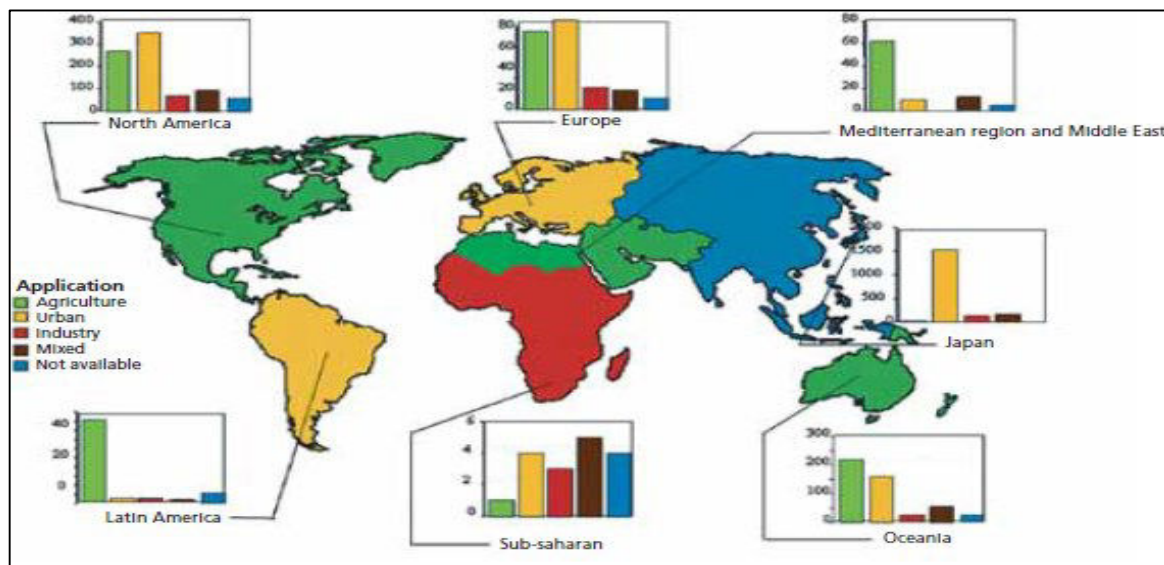


Figure II.2 : Types de réutilisation des eaux usées par domaine d'usage d'après [Bixio et al. \(2008\)](#).

Le recyclage des eaux usées ne cesse d'augmenter dans certains pays comme Israël, les Etats-Unis, la Chine et Australie ([Van der Bruggen, 2010](#)).

Les niveaux de traitements avant recyclage varient en fonction du type de réutilisation et avec les pays. Si certains pays poussent très loin le traitement des eaux usées avant recyclage jusqu'à la potabilisation, plusieurs pays en développement ré-utilisent de l'eau usée brute en agriculture (Tunisie ([Qadir et al., 2010](#)), Pakistan ([Ensink et Van der Hoek, 2006](#))). Il s'agit parfois d'un choix délibéré (éventuellement en opposition avec la politique régionale) pour fertiliser les terres, les eaux usées non traitées étant plus riches en divers fertilisants (notamment N et P) que les eaux usées traitées ([Scott et al., 2010 et 2000](#)). L'expérience de Mexico City apparaît comme le plus important projet de réutilisation des eaux usées au niveau mondial ([Jiménez-Cisneros et Chávez-Mejía, 1997](#)) : presque 100 % des eaux usées brutes de la capitale mexicaine sont réutilisées pour l'irrigation de plus de 85 000 ha supportant diverses cultures agricoles.

Un exemple de projet fonctionnant en France depuis 1996 est le périmètre agricole de l'ASA Limagne noire qui a été initié grâce à un partenariat efficace entre une association d'une cinquantaine d'agriculteurs (ASA Limagne Noire), la communauté d'agglomération Clermontoise, les gestionnaires de la Station d'épuration des eaux usées (STEU) (Véolia-Environnement), la sucrerie de Bourdon (voisine de la STEU) qui a mis à disposition ses lagunes pour un traitement tertiaire des EUT et Somival, l'entreprise qui a conçu et dimensionné le projet. Aujourd'hui, 1500 ha sont équipés pour être irrigués par des eaux usées traitées, 700 ha l'étant en pratique chaque année pour assurer un temps de résidence des eaux usées traitées d'au moins 15 jours dans les lagunes entre avril et septembre. Les cultures sont principalement le maïs et la betterave, irrigués à partir d'asperseurs type canon ou rampe d'irrigation de type pivot (Figure II.3).



Figure II.3 : Principal site de réutilisation des eaux usées traitées en France Clermont-Ferrand
(site géré par l'ASA Limagne noire)

En Europe, la France affiche un certain retard, [Lazarova et Brissaud \(2007\)](#) observaient que seulement 2300 ha étaient irrigués par des eaux usées traitées (EUT), comparée à ses voisins comme l'Italie où pour la seule région de Milan les eaux usées traitées (EUT) irriguent 22000 ha de cultures maraîchères à haute valeur ajoutée ([Mazzini et al., 2013](#)), et l'Espagne dont les ambitions sont de réutiliser la totalité des eaux usées traitées d'ici 5 à 10 ans ([Iglesias et al., 2010](#)).

Plusieurs facteurs peuvent expliquer le retard de la France : les ressources en eaux conventionnelles y sont peu limitantes avec un indicateur de stress hydrique inférieur à 20 % ([Bixio et al., 2006](#)), plus faible que ceux de l'Espagne ou de l'Italie, une réglementation stricte ([Molle et al., 2012 ; Lazarova et Brissaud, 2007](#)) parfois insuffisamment justifiée et pouvant freiner des initiatives dans ce domaine ([Renault et al., 2014](#)). Cependant, même si la ressource en eau en France est globalement supérieure à la demande, chacun a en mémoire les restrictions d'eau imposées dans certaines régions ces dernières années dues aux sécheresses récurrentes liées aux irrégularités des précipitations et l'apparition plus fréquente d'épisodes de canicule. Même si la France se situe en tête des pays producteurs de technologies de traitements des eaux avec des entreprises comme SUEZ Environnement (et notamment Degremont) et VEOLIA-eau, la réutilisation des eaux usées est limitée à quelques sites où il y a clairement une difficulté d'approvisionnement en eau ou un risque pour le maintien de la qualité de la ressource, notamment dans les îles (Porquerolles, Ré, Oléron) ou à proximité des côtes où la surexploitation des aquifères peut entraîner leur salinisation, mais aussi à l'intérieur des terres lorsque la ressource en eau conventionnelle nécessite un transport sur de longues distances (Limagne Noire à côté de Clermont-Ferrand). Certaines collectivités ont fait le pas pour équiper des espaces verts, terrains de golf (Ste Maxime, Pornic, ([Baumont, 2002](#))) ou encore le lavage des voiries, pour aller vers un développement durable, tout en valorisant la ressource en recyclant des déchets, mais les exemples restent relativement rares ([AFD, 2011](#)). Les coûts associés à la réutilisation des eaux usées sont en effet importants au début, avec l'installation des infrastructures nécessaires pour la collecte des eaux usées, leur traitement, leur distribution tout en respectant les règles édictées aux échelles nationales ou régionales (Citons par exemple en France les normes à suivre pour irriguer des parcelles agricoles données par l'Arrêté du 25 juin 2014 que nous présenterons plus loin dans la section II.2.e).

II.2.b. Des risques très divers

En fonction de leurs origines, les eaux usées, peuvent être chargées de nombreux produits chimiques organiques ou inorganiques d'origines domestiques ou industrielles (Leverenz et al., 2011) dont des métaux lourds (Lente et al., 2012 ; Barakat et Schmidt, 2010) et en pathogènes de l'homme (Pachepsky et al., 2011 , Gerba et Smith, 2005). Dans certains pays, les agriculteurs épandent directement les eaux usées brutes non traitées plus chargées en fertilisants tels que l'N et le P (Drechsel et Evans, 2010 ; Qadir et al., 2010 ; Scott et al., 2010). A côté de leur rôle bénéfique pour les sols et les cultures, ces eaux peuvent aussi contenir des composés toxiques pour l'environnement (éléments traces métalliques dont Zn, Cd, As, Pb (Lente et al., 2012), parfois Na⁺, Cl⁻ et borate à fortes concentrations (Sou\ Dakouré et al., 2013), substances organiques émergentes très variées dont les produits pharmaceutiques (Papaïacovou et Papaïeodoulou, 2013). De nombreuses études ont détecté dans les eaux usées des bactéries type salmonelles, légionelles (AFSSA, 2008), des protozoaires (Salgot et al., 2003), des œufs d'helminthes (Salgot et al., 2003), et des virus entériques (Petrinca et al., 2009 ; Symonds et al., 2009). Les risques sont conditionnés par l'existence ou non d'un traitement des eaux, par la nature et le niveau du traitement ainsi que par le niveau de santé des populations.

Néanmoins pour des eaux usées d'origine domestique, les risques liés aux éléments traces métalliques sont faibles, car ils sont retirés très efficacement au niveau des STEU par les traitements conventionnels. La question se pose davantage en ce qui concerne les substances organiques émergentes. En effet, il existe un grand nombre de substances rejetées dans les eaux usées. Même si l'on reste très généralement en-deçà des seuils de toxicité, on manque encore de connaissances sur leurs effets combinés ainsi que sur l'effet d'une exposition chronique à une ou plusieurs de ces substances. En ce qui concerne les risques microbiologiques, la présence d'œufs d'helminthes correspond à un risque mineur en France car les traitements en STEU sont efficaces même en l'absence de traitement tertiaire (Lazarova, 2004). Leur contrôle a été éliminé de la réglementation Française de 2014 relative à la réutilisation des eaux en irrigation, pour partie pour cette raison, et pour partie à cause de la détection de faux positifs. Les bactéries pathogènes dans les eaux usées génèrent un risque plus élevé du fait de concentrations retrouvées plus fortes (jusqu'à 10⁹ bactéries/100 mL pour les salmonelles (Bitton, 2005)), de leur résistance à certains traitements (La Rosa et al., (2010) indiquent toutefois un abattement moyen de plus de 98 % et jusqu'à 6 log₁₀ avec un traitement secondaire, suivi d'une faible chloration), et de l'apparition de souches résistantes. De nombreuses études traitent de leurs devenir dans l'environnement aussi bien dans l'eau, sur le sol ou dans l'air (Morris et al., 2014). Les virus peuvent être retrouvés en forte concentration dans les eaux usées brutes jusqu'à 10⁷ virus.L⁻¹ pour les norovirus et le virus de l'hépatite A (Sidhu et al., 2009). Ils sont également moins sensibles au traitement. Ainsi Bofill-Mas et al. (2006) trouvent par exemple une concentration après traitement secondaire pour les adenovirus de 3 log₁₀ GC.100 ml⁻¹ (en Espagne) et Flannery et al. (2012) notent pour les norovirus des concentrations de 2.58 log₁₀ GC.100 ml⁻¹(au Royaume), Prevost et al., (2015) pour les astrovirus retrouvent des concentration de 3 à 4 log₁₀ GC.100 mL⁻¹ et pour les rotavirus de 2 à 3 log₁₀ GC.100 mL⁻¹ (en France). La mesure de la qualité microbiologique des eaux se fait le plus souvent par la mesure d'indicateurs microbiens tels qu'*Escherichia coli* et les Entérocoques fécaux mais se montre peu fiable comme indicateurs de ces derniers. Ainsi il paraît essentiel d'approfondir les connaissances sur le devenir des virus aussi bien lors des traitements en STEU que du devenir environnemental et lors de la réutilisation de ces eaux en irrigation.

II.2.c. Traitements des eaux usées et effets sur les pathogènes

En pays développés, les traitements des eaux usées d'origine domestique comprennent très généralement 2 à 3 étapes avant leur rejet dans l'environnement (ruisseau, rivière, aquifère, mer), en fonction du niveau de qualité exigé, pour partie associé à la fragilité du milieu récepteur (Figure II.4). Ils débutent par un prétraitement ou traitement primaire destiné à éliminer les solides en suspension, les huiles et les graisses, à l'aide d'opérations de dégrillage, désablage et déshuilage. La décantation primaire associée au désablage permet d'éliminer une partie des solides en suspension ($>100\ \mu\text{m}$) ; elle peut être complétée par une décantation secondaire après ajout de produits chimiques permettant la floculation de matières en suspension et la formation d'agglomérats ensuite éliminés. La coagulation/floculation chimique permettant de retirer davantage de matière solide en suspension (80-90 %) ainsi qu'environ 80-90 % des coliformes et des œufs d'helminthes ([Lazarova, 2004](#)).

Ils se poursuivent par un traitement secondaire destiné d'abord à abaisser fortement la charge en matière organique facilement dégradable, voire à éliminer partiellement N et P ; il s'agit très généralement d'un traitement de type biologique (boues activées ...) en partie piloté par l'aération du système. En sortie de traitement par les boues activées, les eaux usées passent dans un clarificateur qui sert à séparer les eaux des boues. Des microorganismes pathogènes peuvent se retrouver dans ces boues et leur manutention présente des risques pour l'homme ([Wéry et al., 2010](#)). D'autres techniques de traitement secondaire existent comme le lit bactérien – les bactéries sont fixées sur un substrat neutre sur lequel on fait passer les effluents ([Altmeyer et al., 1990](#)) –, le lit immergé – l'effluent traverse le support qui joue le rôle de filtre –, et le digesteur ou méthaniseur permettant de mettre les eaux dans un environnement clos avec des bactéries anaérobies et des archées pour produire du CH_4 et diminuer les charges en composés indésirables. À ce stade, les traitements n'ont que peu d'effet sur les virus avec un abattement entre 0 et $2\ \log_{10}$ ([WHO, 2006](#)).

Dans la plupart des stations d'épuration, les traitements s'arrêtent à ce niveau. Néanmoins, pour les rejets en zones classées « zones sensibles » ou dans le cadre d'une réutilisation des eaux usées pour diverses applications (irrigation agricole, réutilisation industrielle, réutilisation urbaine, injection dans les aquifère, potabilisation de l'eau ...), des traitements plus poussés peuvent être effectués. Les traitements tertiaires sont très variés.

Concernant la réutilisation des eaux usées, l'élimination de certaines des pollutions biologiques et/ou chimiques (éléments traces métalliques, borate, certains microorganismes ...) peut se faire plus ou moins naturellement dans le temps (compétition avec d'autres microorganismes, inactivations liées aux rayonnements solaires en lagune, chauffage d'eau contenue dans des ballons ...). Utilisé en traitement tertiaire, le lagunage consiste à utiliser des bactéries, des algues et les conditions environnementales (lumière et température) pour éliminer des polluants (dans certains cas, le lagunage remplace un traitement par boue activée et constitue un traitement secondaire). En traitement tertiaire, [Verbyla et Mihelcic \(2015\)](#) ont observé une réduction en moyenne d'1 log de virus au bout de 14.5 à 20 jours de lagunage. Toutefois, des traitements tertiaires « plus intensifs » peuvent s'avérer nécessaires pour réduire les risques associés à la présence de pathogènes de l'homme (voire de composés nocifs pour l'homme et/ou l'environnement) et pour être en conformité avec les réglementations régionales ou nationales. Divers procédés peuvent être mis en œuvre pour éliminer les microorganismes pathogènes ([Baumont et al., 2004](#)) avec :

- des procédés physiques :
 - une irradiation au rayonnement UV-C (avec des lampes monochromatiques à 253.7 nm ou des lampes ayant un spectre étalé autour de cette valeur). Elle fait partie des

traitements les plus efficaces pour abattre fortement les teneurs en virus en endommageant leur génôme (ARN ou ADN) : une diminution de 4 \log_{10} pour les adénovirus 40 et 41 peut être observée à 120 mJ.cm^{-1} (Katzenelson et Kedmi, 1979 ; Thurston-Enriquez et al., 2005 ; Lazarova et Bahri, 2004) ;

- de l'ultra-filtration, voire de l'osmose inverse. En combinant un traitement par boues activées à de l'ultrafiltration, on aboutit au concept de bioréacteurs à membrane (BRM) permettant des traitements très poussés et se faisant dans un espace réduit.
- des procédés chimiques avec l'oxydation de constituants des microorganismes et de molécules organiques par le chlore, l'hypochlorite, l'ozone, l'acide peracétique ...). Leur efficacité est fortement dépendante des traitements précédents. La chloration reste difficile à mettre en place mais, dans des conditions optimales, il est possible d'atteindre un abattement des bactéries de 2 à 6 \log_{10} et, pour les virus, de 1 à 3 \log_{10} (WHO, 2006). La Rosa et al. (2010) mesurent des taux moyen d'abattement pour *Escherichia coli* et les entérocoques respectivement de 98.9 et 98.5 % ainsi que pour les entérovirus et adénovirus respectivement 34.6 et 77.1 % (taux d'abattement donnés pour un traitement combinant boue activée et chloration). L'ozonation est une technique alternative. Elle présente l'avantage d'être efficace sur les virus et parasites en agissant de manière directe ou par la formation de radicaux secondaires ($\bullet\text{OH}$). Un abattement de 3 à 5 \log_{10} pour 1 à 5 mg.L^{-1} peut être observé pour le bactériophage MS2 pourtant très résistant (Lazarova et al., 2014 et 2013). Il existe également d'autres composés oxydants comme l'acide peracétique ou l'hypochlorite.

Le choix des traitements dépend de la qualité de l'eau à traiter, du type de culture à irriguer, de la méthode utilisée pour l'irrigation (aspersion, goutte à goutte de surface ou enterré, irrigation gravitaire ...), de l'accès au public et de la proximité de zones sensibles (piscine, aquaculture ...) (Aussel et al., 2004 ; Lazarova, 2004).

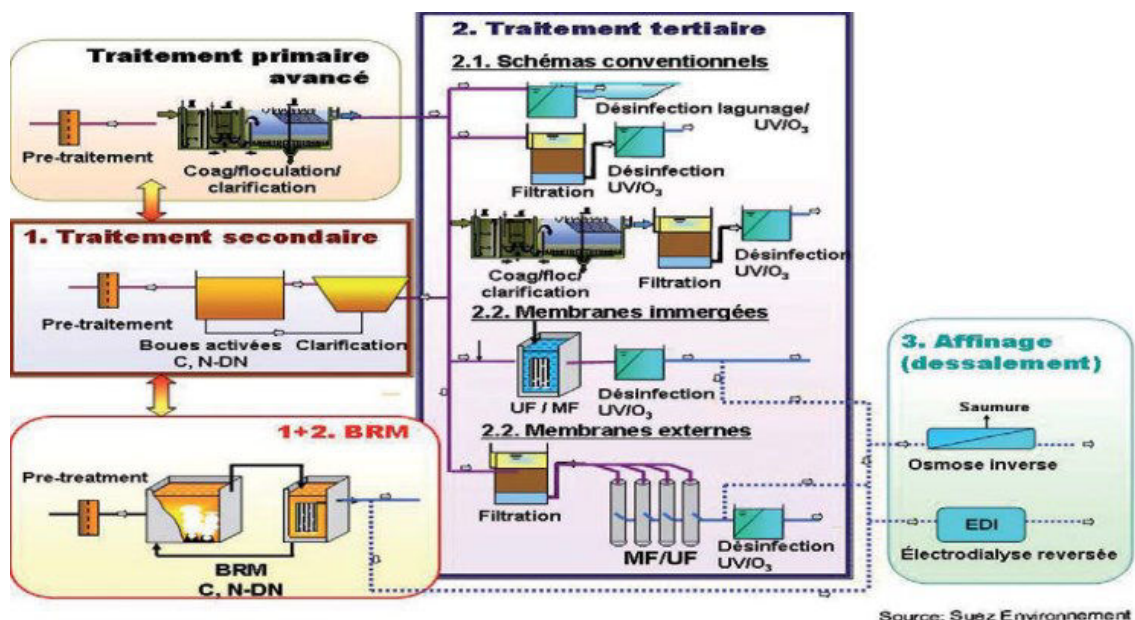


Figure II.4 : Vision schématique du traitement des eaux usées dans les stations de traitement des eaux usées (Lazarova et Brissaud, 2007). (BRM : bioréacteur à membrane, UF : ultrafiltration, MF : Microfiltration)

II.2.d. L'évaluation quantitative des risques pour la santé

L'analyse quantitative des risques microbiens (QMRA en anglais) permet d'évaluer le risque de contracter une maladie ou une infection après exposition à des agents pathogènes par l'intermédiaire d'aliments, d'eau ou de l'air ([Pachepsky et al., 2010](#)). Afin d'aller plus loin et de mesurer l'impact sanitaire, on utilise parfois le DALY (pour Disability Adjusted Life Years) comme indice mesurant le poids (la charge ou le fardeau) d'une maladie pour une personne. Cet indice exprime la durée de vie "perdue" pour cause d'incapacité ou de décès lié à la maladie, au regard de la durée de vie restante sans incapacité en absence de maladie. Il est très souvent exprimé en année(s) perdue(s) par cas de maladie (en pcd pour per case of disease) ou par personne et par an (en pppa par personne et par an). Un calcul a été proposé par [WHO \(1989\)](#) pour le rotavirus : un DALY maximum toléré de 10^{-6} pppa, amène à un risque d'infection maximum toléré d'environ 10^{-3} pppa en pays industrialisé (i.e. 1 personne sur mille attrape une gastroentérite chaque année suite à la contamination étudiée) en lien avec une consommation donnée. Le DALY par cas de maladie peut varier d'une région à l'autre (selon l'Institut de métrologie sanitaire et d'évaluation, [Scheierling et al. \(2011\)](#), [WHO. \(2006\)](#)). L'indice DALY prend en compte les effets aigus (pendant la phase de maladie) mais aussi les effets différés et chroniques (dont la morbidité et la mortalité). Il permet de comparer les effets de maladies différentes, par exemple un cancer et une gastroentérite. Il doit tenir compte du contexte social (effets/conséquences plus ou moins marqué(e)s suivant l'âge, le sexe et le contexte sanitaire des personnes). Il permet une gestion objective des risques sanitaires basée sur des seuils d'acceptabilité.

Cette méthode de quantification des risques présente deux types d'avantages :

- elle permet de se fixer des objectifs indépendants des pathogènes ;
- elle permet d'atteindre ces objectifs soit exclusivement au travers du traitement des eaux usées, soit en tenant compte des facteurs susceptibles d'abattre la teneur en pathogènes après irrigation *in situ* par des eaux usées (type d'irrigation, délais entre la dernière irrigation contaminante et la récolte, traitements des produits après récolte ...) ([Mara et al., 2007](#) ; [WHO, 2006](#)).

Des applications de l'analyse des risques microbiens pour la réutilisation des eaux usées pour l'irrigation ont été publiés et donnent un premier aperçu des risques résultant de la consommation de cultures irriguées par les eaux usées en fonction des agents pathogènes et de leurs concentrations dans les eaux usées pour les virus entériques ([Mara et al, 2007](#) ; [Hamilton et al, 2006](#) ; [Pettersson et al., 2001](#)) mais aussi pour l'inhalation (et l'ingestion involontaire) par les agriculteurs ou les habitants voisins de particules de sol ([Mara et al., 2007](#)). Les modèles développés pour les contaminations par voie aérienne combinent généralement, un modèle d'exposition (ou de dispersion atmosphérique), un modèle de dose-réponse, souvent de type Béta-Poisson et un modèle d'infectiosité ([Pachepsky et al., 2011](#)). [Stellacci et al. \(2010\)](#) ont développé une approche QMRA en considérant un modèle de dispersion hybride gaussien appliqué à des pathogènes type *Campylobacter* et Rotavirus pour estimer les risques sur la santé des travailleurs autour d'une station de traitement des eaux usées en Italie. Ils montrent ainsi qu'il faut au moins maintenir une distance de 300 m entre la station de traitement des eaux usées et les résidents pour réduire les risques sur la santé. Cependant, il faut noter que ces résultats restent des estimations, il n'y a pas eu de mesures associées ni de prise en compte des pratiques liées à l'irrigation dans cette étude.

Les approches de type QMRA restent néanmoins difficile à mettre en place. Elles nécessitent une mesure correcte des pathogènes dans les eaux usées ainsi que la connaissance de leurs devenir réels au cours des traitements, stockages, irrigations, aérosolisation, survie en aérosol et transfert de pathogènes des voies respiratoires aux voies gastroentériques ([Renault, 2014](#)). Elles nécessitent aussi d'avoir une

bonne connaissance des comportements des populations visées (habitude alimentaire et sanitaire...) (Renault, 2014). Enfin, la détection des agents pathogènes reste difficile et couteuse. Pour un DALY de 10^{-6} pppa, ces approches aboutissent à des seuils de concentration en pathogènes qui peuvent être très faibles, par exemple de l'ordre de $5 \cdot 10^{-3}$ rotavirus.L⁻¹ (WHO, 2006). De telles concentrations ne sont bien sur pas mesurables sans étape de préconcentration très forte. L'utilisation de bio-indicateurs plus abondants à la place de virus pathogènes de l'homme pourrait simplifier les contrôles mais les teneurs en virus entériques de l'homme sont très généralement non corrélées aux teneurs en bioindicateurs classiquement associées aux normes et réglementations.

Notre étude s'inscrit dans cette démarche générale de décrire le devenir des virus entériques de l'homme dans l'environnement pour mieux évaluer les risques associés à la voie aérienne de contamination, généralement ignorées des évaluations de risques actuellement disponibles.

II.2.e. Lignes directrices proposées, réglementations et normes :

En France et pour la réutilisation en irrigation, le traitement doit permettre suivant la qualité de l'eau visée d'atteindre une concentration en *Escherichia coli* inférieure à une valeur comprise entre 10^4 et 250 UFC/100 mL (Unit Forming Colony). Aux Etats-Unis, on peut même trouver suivant la destination des eaux usées traitées, des traitements avec une élimination *quasi*totale pour obtenir des coliformes fécaux au-dessous de la limite de détection (dans 100 mL), une turbidité inférieure à 2 NTU (Nephelometric Turbidity Unit), moins de 10 mg.L⁻¹ de DBO (Demande Biochimique en Oxygène) et 1 mg.L⁻¹ de Cl résiduel pour éviter la reprise de la croissance bactérienne dans les réseaux de distribution (Lazarova et Brissaud, 2007). Certains traitements tertiaires peuvent aller jusqu'à la potabilisation de l'eau (cas de Windhoek en Namibie). Actuellement, il n'y a pas de réglementation universelle pour la réutilisation des eaux usées en irrigation agricole. Des réglementations et des normes associées ont été mises en place sur la base du « risque zéro » (US-EPA/US-AID, 2012), d'une approche pragmatique et empirique (WHO, 1989), ou plus récemment d'une évaluation Quantitative du Risque Microbien (QMRA). (WHO, 2006). Plusieurs auteurs critiquent la réglementation passée de la France (Molle et al., 2012 ; Lazarova et Brissaud, 2007), et des scientifiques reconnus militent pour la mise en place d'une réglementation à l'échelle Européenne. (Angelakis, 2012 ; Angelakis et Durham, 2008). De nombreux pays n'ont pas encore légiféré pour prévenir les risques inhérents à la réutilisation des eaux usées (Renault, 2014) ; pour les autres, il y a de grandes variations de réglementations et de normes (Paranychianakis et al., 2010).

La première tentative Française de réglementation de la réutilisation des eaux usées traitées à des fins d'arrosage et d'irrigation date de la fin des années 80 (CSHPF, 1991). Elle s'est largement inspirée des recommandations de l'OMS (WHO, 1989). Elle imposait une demande préalable d'autorisation préfectorale et des règles relativement sévères de distances minimales aux habitations suivant les techniques d'irrigation utilisées (JORF, 2012). Les modifications successives de réglementations (JORF, 2014 et 2012) n'ont pas fondamentalement changé les règles relatives aux distances (cf. par exemple Tableaux I-1). Actuellement, pour pouvoir utiliser les eaux usées traitées pour l'irrigation par aspersion, il faut respecter une distance minimale de 5 m pour des asperseurs de faible portée (<10 m), et 10 m pour les asperseurs de grande et moyenne portée à condition qu'un écran végétal ou artificiel d'une hauteur minimale à celle de l'apogée de l'asperseur. Si ce dispositif n'existe pas, la distance est alors égale au double de la portée de l'asperseur et, en cas de proximité avec des activités protégées (plan d'eau utilisé pour des activités nautiques, bassin aquacole, conchyliculture, abreuvement de bétail et

création) ; dans ce cas il faut ajouter les distances présentées dans le Tableau II.1. Ces contraintes de distance compliquent grandement la réutilisation d'eaux usées en agriculture, obligent les agriculteurs à perdre en surfaces irriguées ou à utiliser deux systèmes d'irrigation en cas de proximité de route, de chemin. Le risque lié à la propagation des aérosols résultant de l'arrosage par aspersion est pointé comme un risque encore difficile à évaluer par manque de mesures de quantification (rapport ANSES (2012)).

Il n'est possible ni techniquement ni économiquement de contrôler la présence dans l'eau de tous les agents pathogènes susceptibles de s'y trouver. On utilise plutôt des bactéries indicatrices de la présence de matières fécales pour vérifier la qualité microbiologique de l'eau. Des indicateurs de qualité des EUT ont ainsi été définis, reposant principalement sur les concentrations en *Escherichia coli*, en coliformes totaux ou en coliformes fécaux (Tableau II.1).

Cependant, il est important de signaler que si la présence d'indicateurs fécaux comme *Escherichia coli* dans une source d'approvisionnement en eau indique que celle-ci peut contenir aussi des micro-organismes pathogènes entériques, l'absence d'indicateurs fécaux ne garantit nullement que l'eau ne contienne pas d'entérovirus et de protozoaires.

Tableau II.1 Synthèse de l'arrêté du 25 juin 2014 ([JORF, 2014](#)) relative aux analyses et à l'utilisation des eaux usées en irrigation

Niveau sanitaire	Condition de réutilisation des EUT	<i>Escherichia coli</i> , (UFC/ 100mL)	Abattement en log ₁₀ pour les Entérocoques fécaux, Spores de bactéries anaérobies sulfito réductrices et les Phages ARN F- spécifiques	Contrainte de distance avec des activités a protégées	Commentaires
A	Cultures maraîchères, fruitières et légumières	≤ 250 (1 fois par semaine [¥])	≥ 4	20-50 m	Technique d'irrigation limitant le mouillage des fruits et légumes Irrigation par aspersion en dehors des heures d'ouvertures Distance >100 m des habitations
B	Irrigations des cultures céréalières, fourragères, des pépinières et des cultures consommables après cuisson	$\leq 10\ 000$ (2 fois par mois [¥])	≥ 3	50-200 m	Les terrains de sport concernés sont ceux utilisés plusieurs semaines après l'arrosage Distance <100 m des habitations :
	Irrigation par aspersion des cultures, prairies pâtures et fleurs vendues coupées				Ecrans pour les aérosols : Protection du personnel d'exploitation
C	Irrigation souterraine ou localisée des cultures de la catégorie B et des espaces verts non ouverts au public	$\leq 100\ 000$ (1 fois par mois [¥])	≥ 2	100-300 m	Epuration préalable pour éviter le colmatage

¥ : Fréquence des analyses

II.3. Les virus entériques de l'homme présents dans les eaux usées

II.3.a. Caractères généraux des virus

Les virus sont des parasites obligatoires, ce qui signifie que leur multiplication est impossible hors des cellules. Ainsi, leur présence dans l'environnement ne peut être que la conséquence d'un apport. [Lwoff et al. \(1953, 1959\)](#) ont proposé les critères qui définissent actuellement les virus :

- un virus ne contient qu'un seul type d'acide nucléique (ADN ou ARN) ;
- l'acide nucléique est entouré d'une structure protéique (la capsid) qui le protège et porte les récepteurs spécifiques à l'hôte pour les « virus nus ». L'ensemble acide nucléique et capsid est appelé nucléocapsid ;
- un virus peut être constitué uniquement d'une nucléocapsid (Figure II.5) dans ce cas il est dit « nu ». S'il est recouvert d'une enveloppe externe, on dit que le virus est enveloppé ;
- un virus ne peut se reproduire qu'à partir de son seul génome par réplication. Le virus n'ayant aucun métabolisme, dépend entièrement de la cellule hôte et est donc un parasite obligatoire.

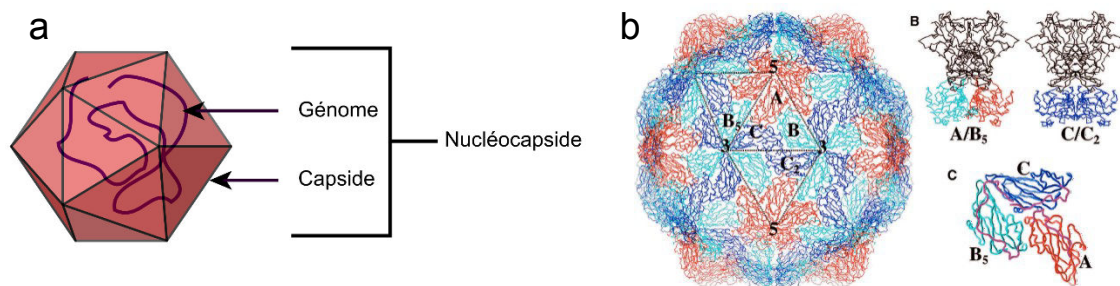


Figure II.5 Structure d'un virus nu. a) Représentation générale d'un virus nu ; b) Représentation de la capsid du Norwalk virus (norovirus) et des protomères (A, B, C) tirés de ([Prasad et al., 1999](#)) les sous unités asymétriques sont colorées en rouge et bleu (foncé et clair)

Les virus sont de taille très variable allant de la douzaine de nanomètres pour le « feather disease virus » (BFDV) à plus de 0,7 μm pour les Pandoravirus). Des virus ont été retrouvés comme parasites de tous les règnes connus (*Archea*, *Bacteria*, *Protista*, *Fungi*, *Plantae*, *Animalia*), et aussi de manière plus surprenante des virus, à travers des virophages, virus parasitant d'autres virus ([Zhang et al., 2012](#) ; [La Scola et al., 2008](#)). Comme décrit par [Lwoff et al. \(1953, 1959\)](#), il existe une structure commune à tous les virus, la nucléocapsid. Or, même avec cette caractéristique commune, il existe une très grande variété organisationnelle dont la complexité est directement liée à la taille du génome viral.

L'acide nucléique au centre de la capsid peut être constitué d'ADN comme pour les *Adenoviridae* ou d'ARN comme pour les *Picornaviridae*. Il peut être bi- ou monocaténaire avec une taille pouvant aller de 4 à 2500 gènes codant pour une ou plusieurs protéines. Contrairement aux bactéries dont le génome est exclusivement circulaire, celui des virus peut être linéaire ou circulaire comme pour le virus de l'hépatite B. Il existe même des virus à génome segmenté ce qui favorise les recombinaisons génétiques comme pour les *Orthomyxoviridae* (virus grippaux) rendant éphémère l'efficacité des vaccins.

Les virus à ARN simple brin (auxquels appartiennent la plupart des virus entériques) ont la particularité de porter soit une molécule d'ARN de polarité positive (ARN⁺) pouvant être traduite directement en

protéine virale par la cellule, soit une molécule d'ARN de polarité négative (ARN⁻). Dans ce dernier cas, l'ARN n'est pas directement infectieux et doit être transcrit par une enzyme virale en ARN⁺.

La capside est constituée d'un autoassemblage par liaison faible de protéines (protomère) identiques ou non, codées par le génome viral et réparties en sous-unités appelées capsomères (Figure II.5b).

Il existe deux structures principales de capside naturellement adoptées par les protéines pour minimiser l'énergie d'assemblage ; la forme hélicoïdale et la forme icosaédrique (à l'exception de certains bactériophages à morphologie plus complexe). Certaines expériences (portant sur l'inactivation) ont été menées avec des bactériophages de manipulation parfois plus faciles, mais la Figure II.6 montre qu'il faut être prudent sur les interprétations qui en ressortent car la structure de ces derniers peut être très différente de celle des virus entériques ; s'y ajoutent par ailleurs des différences au niveau des protéines et des groupes fonctionnels à la surface de la capside.

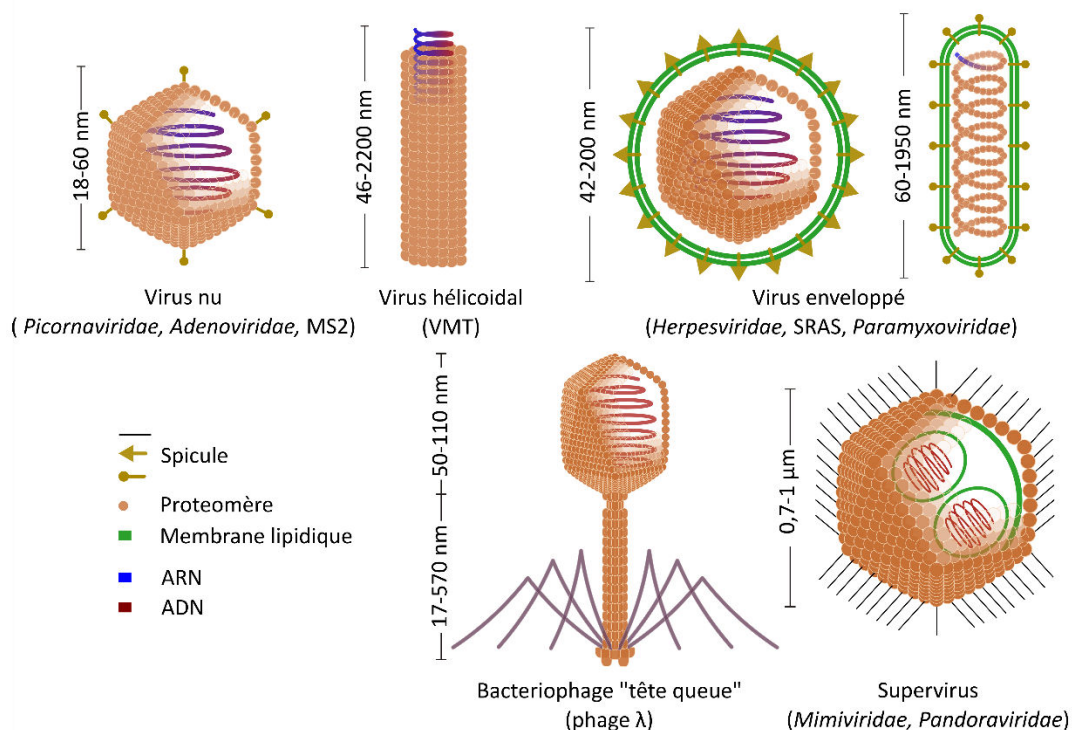


Figure II.6. Exemple des principales caractéristiques structurales des virus

En bleu les virus présents dans les eaux usées ou suspectés

Les virus sont classés en familles, genres, et espèces, regroupés en tenant compte de leurs caractéristiques morphologiques et génomiques (voir « International Committee for the taxonomy of viruses » (ICTV)). Les familles les plus fréquemment retrouvées dans les eaux usées (EU) sont les *Picornaviridae* (ex :virus de l'hépatite A) et *Caliciviridae* (norovirus, GI et, GII, responsables de près de 80% de gastroentérites). La plupart des virus entériques sont des virus nus ; leur capside possède de ce fait des sites d'attachement aux récepteurs membranaires de la cellule hôte (pour les virus enveloppés c'est la membrane qui joue ce rôle). Les *Picornaviridae* ont une capside de forme dodécaédrique avec douze faces pentagonales composées chacune de cinq capsomères, eux-mêmes composés de quatre protéines. Les adenovirus ont une capside plus complexe avec des protomères composées de 6 protéines répétées en grand nombre et comprennent un génome plus important. Quelques virus enveloppés sont parfois assimilés à des virus entériques. Ainsi, le virus du syndrome respiratoire aigu sévère (SRAS)

appartenant à la famille des *Coronaviridae* composée principalement de pathogènes respiratoires a été retrouvé dans les selles de patients infectés ([Sous-comité fédéral-provincial sur l'eau potable, 1996](#)). Et même si le mode principal de transmission du SRAS reste le contact de personne à personne, une transmission par les eaux usées peut être supposée ([Sous-comité fédéral-provincial sur l'eau potable, 1996](#)).

Aucun virus à enveloppe n'a été détecté dans les eaux usées et aucun virus entérique ne possède d'enveloppe. L'enveloppe, plus facilement altérée que la capsid, rend les virus enveloppés plus fragiles et plus sensibles aux traitements ([Knipe et Howley, 2007](#)). L'altération de leur enveloppe suffit à inactiver les virus.

Faisant partie des virus enteriques, le virus de l'hépatite A (VHA) est souvent présent dans les eaux usées, notamment dans de nombreux pays en développement, sur le pourtour méditerranéen, par exemple en Egypte où cette maladie reste encore très endémique ([Hanafiah et al., 2011](#) ; [Jacobsen et Wiersma, 2010](#) ; [Kamel et al., 2011](#)). Le VHA fait partie des dix contaminants que l'Agence de Protection de l'Environnement aux Etats-Unis proposait d'ajouter aux contaminants déjà suivis pour les eaux du robinet ([Hoffman et al., 2009](#)). Le VHA est en effet la première cause d'hépatite virale aiguë dans le monde avec un nombre de cas par an estimé à 1,4 million, avec preuves sérologiques d'une infection antérieure dans 15 à 100 % des cas ([WHO, 2006](#)). Le facteur qui semble contribuer à l'augmentation de la mortalité serait l'âge des patients au-delà de 40 ans ([Vaughan et al., 2014](#)). Dans 85% des cas, les personnes infectées par le virus mettent entre 15 et 50 jours avant de présenter des symptômes non spécifiques de la maladie. Cette période d'une durée comprise entre 1 jour et 2 semaines précède les signes de jaunisse. Dans le cas d'hépatite A aiguë, des symptômes extra hépatiques peuvent apparaître comme des hémolyses, des épanchements pleuraux et péricardiques, des pancréatites ainsi que des insuffisances rénales aiguës, voire des manifestations neurologiques. Le taux de mortalité est variable suivant les épidémies. Lors de l'épidémie de Shanghai en 1988, le taux de mortalité n'a été que de 0.01 % sur 292301 personnes contaminées alors que l'épidémie apparue au Tennessee en 1944 s'est accompagnée d'un taux de mortalité de 2 % pour 256 cas ([Cuthbert, 2001](#)). Cette différence peut s'expliquer d'une part par l'âge des personnes contaminées mais également par une immunité acquise durant l'enfance à Shanghai (contrairement à la population du Tennessee) entraînant une immunisation à l'âge adulte de cette population.

Le génome du VHA est constitué d'un ARN simple brin de polarité positive possédant d'approximativement 7,5 kb. Une modification du génome viral par des agents mutagènes (ex : rayonnement UV) peut stopper le cycle viral et ainsi inactiver le virus ([Jean et al., 2011](#)).

La capsid constitue la seule protection des *Picornaviridae* vis-à-vis des conditions extérieures. Pour le virus de l'hépatite A comme pour tous les virus de la famille des *Picornaviridae*, les protéines structurales de la capsid sont au nombre de quatre (VP1, VP2, VP3 et VP4) s'auto-assemblant en pentamères suivant douze unités formant la procapsid. Les différences significatives de séquences d'acides aminés et de conformations des protéines sont des pistes pour expliquer la résistance supérieure du VHA à la température, au pH et à certains produits chimiques (Guanidine et Desoxaril) par rapport aux autres *Picornaviridae* ([Hollinger et Emerson, 2007](#) ; [Roque-Afonso et al., 2006](#) ; [Fujioka et al., 1969](#)).

Il existe trois types d'infections virales : lytique, latente et transformante. Le VHA passe d'abord dans le système digestif, soit par ingestion directe de la particule virale par l'eau ou par des aliments, soit par

ingestion avec déposition de la particule virale au niveau des voies respiratoires supérieures puis passage dans le système digestif lors de la déglutition. Le virus atteint ensuite dans le système circulatoire après passage à travers les intestins et se fixe ensuite sur un hépatocyte pour commencer son cycle viral (Vaughan et al., 2014 ; Cuthbert, 2001). Une infection de type lytique finit par une destruction rapide de la cellule infectée et le relargage des virus produits. C'est ce type de destruction qui est observé lors de la mesure de l'effet cytopathique et l'obtention de plages de lyse, l'unité de cette quantification étant le pfu (« Plaque-Forming-Unit »). La lyse de la cellule infectée peut être due à l'activation de processus enzymatiques ou être la résultante des dommages de la cellule. À l'inverse, les infections latentes ne débouchent pas nécessairement sur la lyse de la cellule. Ces infections sont dues à un blocage de la plupart des fonctions d'expression du génome viral ; ainsi il n'y a alors pas de réplication virale (Harper, 2012). Il y a toujours réplication, mais à un taux très faible. Par conséquent la réponse immunitaire est modérée et une tolérance vis-à-vis des antigènes viraux peut s'établir. On peut observer dans certains cas l'apparition d'un syncytium constitué d'une fusion des cellules infectées.

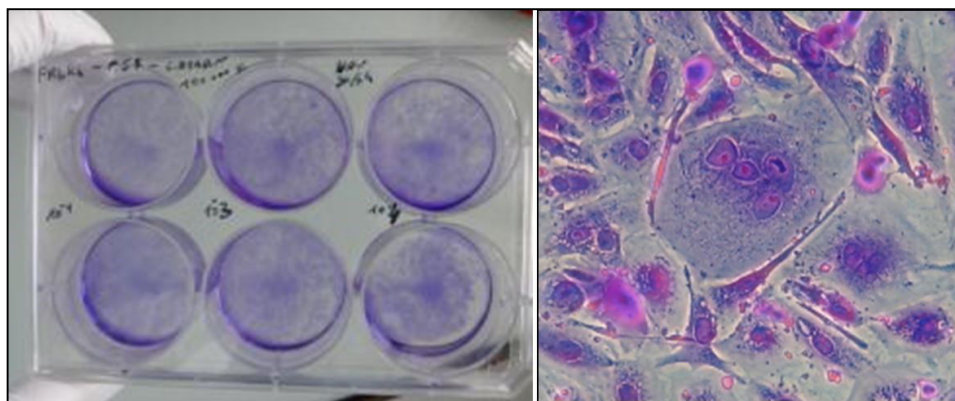


Figure II.7. Syncytium observé sur le VHA après coloration au cristal violet

Pour le virus de l'hépatite A, la réplication virale *in vivo* est limitée aux cellules hépatocytaires et épithéliales du système digestif. L'ARN viral est répliqué dans le cytoplasme cellulaire après synthèse d'ARN négatif intermédiaire qui sert de matrice pour la fabrication des autres brins. L'ARNsb (ARN simple brin) rattaché à la protéine VPg est ensuite enfermé dans une capsidie icosaédrique formée par l'association de sous unités des quatre protéines structurales (VP1, VP2, VP3 et VP4). Les virions nouvellement formés quittent ensuite la cellule (Figure II.8).

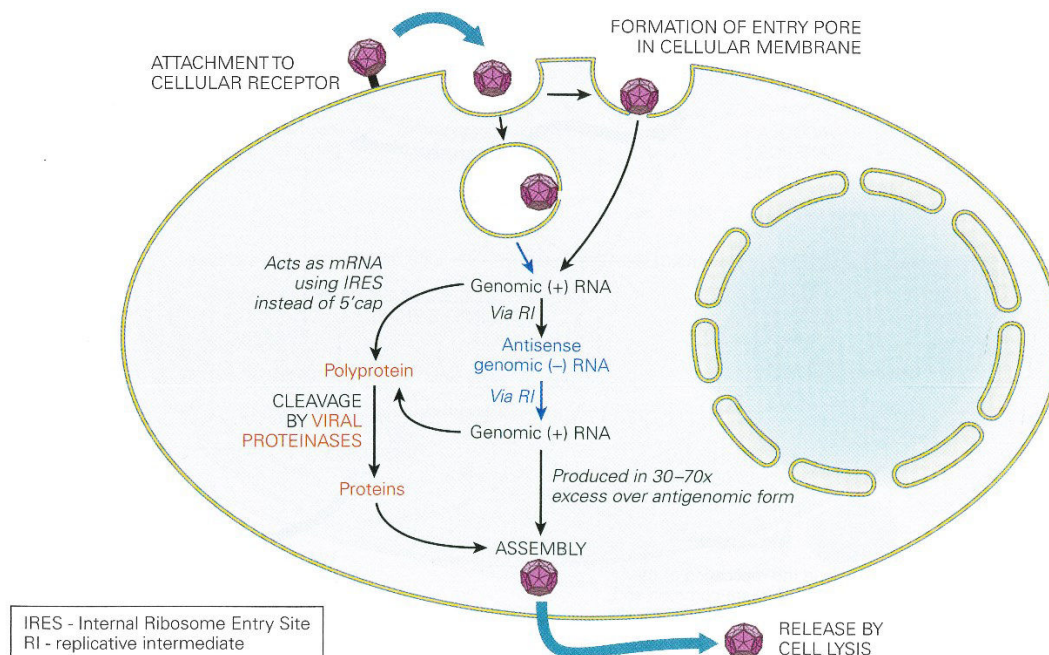


Figure II.8. Shéma du cycle réplcatif des picornavirus d'après [Harper \(2012\)](#).

II.3.b. Présence des virus entériques de l'homme dans les eaux

Avec le développement de méthodes de détection et de dénombrement de virus aux teneurs environnementales, la transmission environnementale des virus entériques est de plus en plus souvent incriminée dans les épidémies d'origines alimentaire et hydrique de l'homme. La majorité des virus retrouvés dans les eaux usées sont des virus nus (voir Tableau II.2). Il s'agit de virus entériques (à ne pas confondre avec les entérovirus qui constituent un genre bien définie ([Bosch, 1995](#))).

Tableau II.2. Principaux virus pathogènes de l'homme et bactériophages rencontrés dans les eaux usées d'après ([Baudart et Paniel, 2014](#) ; [Le Guyader et al., 2014](#) ; [Sidhu et Toze, 2009](#) ; [WHO, 2006](#) ; [Bosch, 1998](#))

Virus	Famille	Genre	
Poliovirus	<i>Picornaviridae</i>	Enterovirus	ARNsb+
Coxsackievirus (A et B)	<i>Picornaviridae</i>	Enterovirus	ARN sb+
Echovirus	<i>Picornaviridae</i>	Entérovirus	ARN sb+
Norwalk Virus	<i>Caliciviridae</i>	Norovirus	ARN sb+
Human Astrovirus	<i>Astroviridae</i>	Mamastrovirus	ARN sb+
Adenovirus	<i>Adenoviridae</i>	Mastadenovirus	ADN db
VHA	<i>Picornaviridae</i>	Hepatovirus	ARN sb+
VHE	NA	Hepevirus	ARN sb+
<i>Rotavirus</i>	<i>Reoviridae</i>	Rotavirus	ARN db
Human parvovirus B19	<i>Parvoviridae</i>	Erythrovirus	ADNsb+/-
MS2	<i>Leviviridae</i>	Levivirus	ARN sb+
T3	<i>Podoviridae</i>	T7-like viruses	ADN db
Phi x174	<i>Microviridae</i>	Microvirus	ADN sb

Les virus entériques les plus couramment trouvés dans les eaux usées entraînent diverses pathologies chez l'homme (par exemple les norovirus et les rotavirus sont responsables de gastroentérites pouvant entraîner des complications graves chez les enfants, les adenovirus peuvent être responsables de pharyngites, pneumonies ou conjonctivites). Une maladie infectieuse est la résultante d'une infection par un microorganisme pathogène qui envahit un hôte et provoque des

dysfonctionnements cellulaires et métaboliques associés aux symptômes de la maladie. On parle alors pour caractériser l'infectiosité des virus de facteurs de pathogénicité, de virulence et d'invasion. Ces facteurs définissent la physiopathologie de la maladie infectieuse ([Knipe et Howley, 2007](#) ; [Genetet, 2002](#)).

La composition microbiologique des eaux usées traitées est extrêmement variable selon la saison, l'origine des eaux usées collectées, l'état sanitaire des populations, le traitement appliqué dans la STEU ([Pusch et al., 2005](#) ; [Van Den Berg et al., 2005](#)). Chez une personne infectée on peut trouver de 10^{10} à 10^{12} particules virales par gramme de selles. D'après la revue bibliographique faite par [Sidhu et Toze \(2009\)](#), les concentrations trouvées dans les eaux usées peuvent atteindre 10^2 à 10^4 virus.L⁻¹ pour les Rotavirus, de 10^3 à 10^7 virus.L⁻¹ pour les norovirus, 10^3 virus.L⁻¹, pour les adenovirus et 10^7 virus.L⁻¹ pour le VHA. Les analyses faites par [La Rosa et al. \(2010\)](#) sur de l'eau usée en entrée et sortie de 5 STEU dans les environs de Rome ayant un traitement avec une désinfection au chlore montrent qu'il reste des teneurs en norovirus de type GI de l'ordre de $1.8.10^8$ GC.mL⁻¹ en sortie de STEU. [La Rosa et al. \(2010\)](#) observent également un abattement de l'ordre de 78 % pour le norovirus GI et de 62% pour le norovirus GII, de 77 % pour l'adenovirus et seulement de 34.6 % sur les enterovirus, alors que ces mêmes traitements permettent d'éliminer *Escherichia coli* à 98.9 %. On constate bien ici que les indicateurs de qualité des eaux basées sur les bactéries reflètent mal le comportement des virus à certains traitements des eaux usées. Il a été montré que la présence de pathogènes dans les eaux usées traitées et notamment des virus entériques a pu entraîner la contamination de coquillages puis des consommateurs ([Le Guyader et al., 2012](#)).

Il est important de noter ici que dans les suivis classiques des EUT, il n'y a pas d'analyses sur les virus entériques, pourtant de plus en plus souvent incriminés dans les épidémies d'origines hydrique et alimentaire ([Da Silva et al., 2011 et 2007](#) ; [Le Guyader et al., 2010](#)), dues entre autres au virus de l'hépatite A ([Villar et al., 2007](#)) et au virus de l'hépatite E ([Masclaux et al., 2013](#)). Le Tableau II.3 d'après [Sidhu et Toze \(2009\)](#) et [WHO \(2006\)](#) donne des ordres de grandeurs des quantités de virus qui peuvent être retrouvés dans les eaux usées et de leur mode de transmission.

Tableau II.3 : Concentrations retrouvées dans les eaux usées brutes pour les principaux virus enteriques (englobe les valeurs relevées dans les articles cités)

Genre	Espèces virales retrouvées dans les eaux usées	Concentrations retrouvées dans les eaux usées brutes	Références
Enterovirus	Poliovirus	10-10 ⁷ gc.mL ⁻¹	(Hewitt et al., 2011)
	Virus coxackie A		(Chigor et Okoh, 2012)
	Virus coxackie B		(La Rosa et al., 2013)
	Echovirus		(Chigor et Okoh, 2012)
Hepatovirus	Virus de l'hépatite A	10 ¹ -10 ⁷ gc.mL ⁻¹	(Villar et al., 2007) (Albinana-Gimenez et al., 2006)
Adenovirus	Adenovirus	10 ³ -10 ⁹ gc.mL ⁻¹	(Hewitt et al., 2011)
Norovirus	GI	10 ³ -10 ⁹ gc.mL ⁻¹	(La Rosa et al., 2010)
	GII		
Rotavirus	Rotavirus	10 ² -10 ⁵ gc.mL ⁻¹	(Paranychanakis et al., , 2010)
		10 ¹ -10 ³ gc.mL ⁻¹	(Chigor et Okoh, 2012)
Astrovirus	Astrovirus humain	10 ⁶ -10 ⁸ gc.mL ⁻¹	(Le Cann et al., 2004)

Les gastro-entérites à norovirus ou « *winter vomiting disease* » représentent plus de 80% des épidémies de gastro-entérites chez l'adulte et plus de 90 % des épidémies non bactériennes (Koopmans et Duizer, 2004 ; Koopmans et al., 2002). Ces maladies généralement peu sévères associant fréquemment diarrhées et vomissements touchent toutes les tranches d'âge, et représentent un problème de santé publique notable. Plusieurs études ont rapporté que plus de 50 % des ouvriers travaillant dans les stations d'épuration présentaient des anticorps dirigés contre le virus de l'hépatite A et une augmentation de troubles gastro-intestinaux (Uhrbrand, 2012 ; Uhrbrand et al., 2011 ; Brugha et al., 1998 ; Altmeyer et al., 1990). Des virus de l'hépatite E sont retrouvés dans l'environnement de stations d'épuration suisses (Masclaux et al., 2013). Signalons de plus que l'agence de protection environnementale américaine (US EPA) publie chaque année une liste de contaminants importants à surveiller ; on retrouve des virus entériques (norovirus, adenovirus, rotavirus et VHA) parmi les 10 pathogènes proposés en 2009 (CCL3¹).

¹ <http://water.epa.gov/scitech/drinkingwater/dws/ccl/ccl3.cfm#microbial>

II.4. Devenir « atmosphérique » des virus : aérosolisation et inactivation

II.4.a. Aérosolisation ou ré-aérosolisation

L'irrigation par des eaux usées au champ peut donc aboutir à une contamination des sols (Urbanucci et al., 2009), des eaux souterraines (Lodder et al., 2010), des cultures (Cook et D'Agostino, 2013) ainsi qu'à une aérosolisation de pathogènes (virus et bactéries) à partir d'irrigation par aspersion (Metcalf et al., 1995 ; Shuval et al., 1989). Au voisinage de STEU, on a déjà montré que les virus peuvent être aérosolisés (Sánchez-Monedero et al., 2008 ; Bauer et al., 2002 ; Carducci et al., 2000), parcourir alors des distances plus ou moins importantes, et constituer un danger potentiel pour les travailleurs de STEU et les riverains (Grisoli et al., 2009 ; Heinonen-Tanski et al., 2009 ; Carducci et al., 2000). Des exemples de dispersion aérienne de virus responsables de diverses maladies ont été rapportés dans la littérature ; ils montrent que les distances de transport peuvent être très importantes et dépasser largement 100 m suivant la taille des particules dans l'air (Casal et al., 1995).

La contamination par des pathogènes liée aux eaux usées peut se faire suivant différentes voies (digestive, respiratoire voire cutané). Lorsque les virus sont aérosolisés, le risque d'exposition est lié à l'inhalation. Le transfert des particules virales dans l'organisme peut combiner l'inhalation de virus seul ou attaché à d'autres particules, leur dépôt dans les voies respiratoires supérieures, et *in fine* leur déglutition avec le mucus des voies respiratoires (Nazarovoff, 2011). Plus les particules pathogènes sont petites, plus elles pénétreront loin dans l'organisme, les virus essentiellement de taille nanométrique sont susceptibles de descendre au niveau des alvéoles pulmonaires. Néanmoins, cela n'a d'intérêt que pour les virus respiratoires (ex virus grippaux), les virus entériques quant à eux demandent obligatoirement de passer par la voie digestive pour infecter l'organisme. Les divers pathogènes trouvés dans les eaux usées et émis dans l'atmosphère peuvent être transportés sur des distances variables et atteindre les personnes manipulant des eaux usées comme les populations à proximité des lieux d'épandage. In situ, la présence de virus entériques de l'homme dans l'air a été notée au voisinage des stations de traitement des eaux usées, en particulier pendant les épisodes venteux (Masclaux et al., 2014 ; Ziros et al., 2011 ; Fracchia et al., 2006 ; Carducci et al., 1995), et lors d'épandages de biosolides (Brooks et al., 2005).

Des contaminations *via* l'air par des virus entériques de l'homme avec symptômes à la clé ont été clairement démontrées et différentes études ont souligné le lien entre infections gastro-intestinales et exposition aux bioaérosols au restaurant (Marks et al., 2000), à école (Marks et al., 2003) et en hôpital (Nenonen et al., 2014) en STEU ou aux abords de zone d'aspersion d'eaux usées (Khuder et al., 1998 ; Katzenelson et Telch, 1976). De plus les bioaérosols peuvent être détectés sur de grandes distances ainsi Bausum et al (1982) ont observé après aérosolisation par source à $2.5 \cdot 10^5$ PFU.mL⁻¹, une détection de $4.6 \cdot 10^2$ PFU.mL⁻¹ à une distance de près de 563 m après forte diminution dans les 100 premiers mètres à partir de la source d'émission. Il est important de rappeler que très peu de virus suffisent pour induire une maladie de l'ordre de 1 à 10 virus infectieux pour le VHA (Bitton et al., 2005). Une fois dans l'atmosphère, les microorganismes peuvent être transportés plus ou moins loin selon les types de circulations atmosphériques. Suivant les conditions microclimatiques, certains pathogènes peuvent rester dans l'atmosphère pendant plusieurs jours avant d'être redéposés par les précipitations ou en dépôts secs (Matthias-Maser et al., 2000). Le taux d'aérosolisation et de survie des microorganismes en général dans l'atmosphère est sous l'influence de paramètres météorologiques comme la vitesse du vent, le taux

d'humidité et la température (Coakley et Scherm, 1996 ; Walter et al., 1990). Coakley et al., 1996 ont montré par exemple que l'effet des changements climatiques pouvait avoir un impact significatif sur le développement de pathogène et induire des distributions géographiques d'épidémies très différentes sur certaines régions du globe. Des travaux de recherche sont menés actuellement par exemple sur l'impact des aérosols en zone désertique et du climat sur les épidémies de méningites au Sahel (voir [gisclimat](http://www.gisclimat.fr/projet/adcem)² et Sultan et al., (2005)). De nombreuses études ont porté sur l'aérosolisation des pollens, leur émission, leur transport dans l'air et sur l'impact sur la santé (voir la revue de l'action COST³).

Différentes approches de modélisation du transport du pollen comprenant des modèles de survie ont été proposées (Vogelet al., 2008 ; Dupont et al., 2006). Une équipe allemande (Burrows et al., 2009) a établi des cartes de dispersion des bactéries dans l'atmosphère à l'échelle globale à l'aide de modèles de circulation atmosphérique. Même si certains modèles climatiques comprennent des modules permettant de simuler le transport des aérosols tels que le modèle MesoNH avec le module aérosol ORILAM (Tulet., 2005), ou encore CHIMERE développé au LMD couplé avec divers modèles atmosphériques (MM5, WRF, ces derniers modèles sont utilisés à AIRPACA⁴ pour prédire la qualité de l'air en polluants dans la région Sud-Est), les bioaérosols restent encore difficile à prendre en compte dans ces modèles complexes, à la fois par manque de données pour paramétrer correctement les principaux processus d'émission, transport et inactivation, et d'autre part, en raison du comportement unique de chaque famille de microorganisme vis-à-vis de l'environnement. Des modélisations plus « simples » basées sur une représentation de la dispersion suivant par exemple un panache gaussien ont été plutôt employées pour estimer les distances que peuvent atteindre les microorganismes pour différentes applications (Dungan, 2010 ; Holmes et Morawska, 2006 ; Bausum et al., 1982).

II.4.b. Inactivation dans l'air

Il existe de nombreuses études sur l'effet de la température (Bertrand et al., 2012 ; Duizer et al., 2004 ; Strazynski et al., 2002 ; Nasser et Oman, 1998 ; Enriquez et al., 1985 ...), du rayonnement (Rule Wigdinton et al., 2010 ; Thurston-Enriquez et al., 2003 ; Fujioka et Yoneyama, (2002) ; Gerba et al., 2002...) et même de l'injection d'ozone en milieu liquide (Lin et Wu, 2006 ; Herbold et al., 1989....). Il en ressort que la température a un effet notable sur la survie des virus, mais que celle-ci varie en fonction du virus étudié et de la composition du milieu ou la teneur en matière organique. Pour le rayonnement la plupart des études ne traitent que de désinfection avec des doses très supérieures aux valeurs environnementales, cependant Fujioka et Yoneyama, (2002) montrent un abattement de près de 3 log₁₀ en 4 h d'exposition à la lumière du soleil à une température maintenue entre 15 et 26°C. Pour l'O₃ les conditions testées sont trop éloignées des conditions en aérosol (réaction chimique, dose testée ...) pour pouvoir nous orienter sur son effet sur les virus aérosolisés. Ainsi, à l'exception d'un transfert sous forme de gouttelette, il apparaît difficile voire impossible d'extrapoler les résultats en milieu liquide aux bioaérosols, leurs effets combinés avec l'humidité relative ne pouvant être pris en compte.

Plusieurs travaux ont porté sur l'inactivation de virus en suspension dans l'atmosphère. Les dispositifs expérimentaux utilisés sont très divers. La mise en suspension des virus dans l'atmosphère était assurée par des nébuliseurs, des atomiseurs, voire un pulvérisateur avec temps de mise à l'équilibre,

²<http://www.gisclimat.fr/projet/adcem>

³ <http://www.unifi.it/COSTEupol/index.html>

⁴<http://airpaca.org/>

les volumes utiles de réacteurs ont varié de 2 L à 2 m³ (Tableau II.5). Certains sont en circuits ouverts (McDevitt et al., 2012 et 2007 ; Walker et al., 2007 ; Jensen, 1964) et balayés par de l'air (10 à 28 L.min⁻¹) avec des temps de séjour allant de 0.24 s à 16 s (Tableau II.4). Ils ont servi à travailler sur l'effet des UV-C à des doses allant de 0.1 et 26 J.m⁻². Ces valeurs, faibles au regard des doses préconisées pour détruire environ 99.99 % des virus (Lazarova, 2004), permettaient d'inactiver pour partie les virus. Malheureusement, ces résultats ne sont pas transposables aux contextes environnementaux. Des travaux plus nombreux ont utilisé des dispositifs fermés pour suivre les cinétiques d'inactivation de virus aérosolisés sur des durées allant de 5 min à 223 h (Tableau II.5) (Zhao et al., 2012 ; Liu et al., 2012 ; Tseng et Li, 2006 ; Ijaz et al., 1985a et b ; Sattar et al., 1984 ; Adams et al., 1982 ; Mik et al., 1977 ; Akers et al., 1973 ; Akers et al., 1968 ; De Jong et Winkler, 1968 ; Akers et al., 1966). Les études portaient essentiellement sur les effets de la température et de l'humidité relative de l'air dans des domaines compatibles avec des valeurs environnementales (T comprise entre 6 et 32°C ; HR comprise entre 10 % à 95 %) ; Tseng et Li., (2006) ont abordé l'effet de la concentration en O₃ dans des gammes compatibles avec les concentrations *in situ* ; il n'y a jamais utilisation de rayonnement UV. Les virus sont variés (otavirus, reovirus, coronavirus, poliovirus, mycobacteriophage, bacteriophages (MS2, φx174, φ6 et T7) et Gumboro vaccine virus) mais restreints à ceux que l'on sait cultiver. Quatre études sur les 12 recensées ont utilisé des indicateurs de niveau de récupération (rhodamine B (Sattar et al., 1984), spores de *Bacillus subtilis* (SBS) (Adams et al., 1982 ; Mik et al., 1977), uranine et ARN viral (Zhao et al., 2012)) pour évaluer indirectement le taux de récupération des virus totaux (i.e. infectieux ou non), avec alors correction des données sur les virus infectieux. Les teneurs en suspension de traceur peuvent diminuer progressivement dans le temps ; les teneurs en suspension de SBS atteignent des valeurs voisines de 75 % de leur valeur initiale 2h30 après leur aérosolisation dans le travail d'Adams et al. (1982). Malheureusement, les 3 autres travaux ne présentent aucune donnée sur l'évolution de leur(s) traceur(s) respectif(s) au cours du temps. En absence de processus susceptible d'affecter l'ARN viral, le nombre de copies de génome utilisé par Zhao et al. (2012) est certainement le traceur idéal de la quantité de virus restant en suspension dans l'air ; l'utilisation comparée de l'ARN viral et de l'uranine par ces auteurs montrent que la nature solide ou de solutés du traceur jouent sur sa pertinence. On peut imaginer que cette pertinence dépend aussi de la taille initiale des gouttelettes aérosolisées, et d'autres caractères spécifiques à chaque traceur.

Quelques travaux basés sur le suivi de virus en suspension dans l'air en système fermé suggèrent que se succèdent (ou que se superposent) une inactivation "quasi-instantanée" et une inactivation « cinétique » plus lente (Zhao et al., 2012 ; Ijaz et al., 1985a et b ; Sattar et al., 1984 ; De Mik et al., 1977 ; De Jong et al., 1968). L'inactivation "quasi-instantanée" peut concerner, en 2.3 min, jusqu'à 99.9 % des Gumboro Vaccine virus à 30°C et 40 % d'humidité relative (Zhao et al., 2012) ; elle croît avec la température (2 log₁₀ d'abattement supplémentaire entre 10 et 30°C) et décroît avec l'humidité relative (division par 2 à 3 en passant de 70 à 40 % d'HR). Si l'équilibre entre eau liée aux virus aérosolisés et humidité relative n'est pas certain sur cette durée (gouttelettes initialement de 10 µm), certains travaux ont montré des déformations de grosses capsides au cours de la dessiccation après dépôt sur un support. De toute évidence la stabilité de l'assemblage des protéines de la capside, est dépendante des forces de cohésion intermoléculaires qui peuvent être réduites par l'agitation thermique (Ausar et al., 2006 ; Phelps et al., 1995).

Les abattements initiaux sont comparables en ordre de grandeur pour le reovirus (environ 40 % en 30 min à 20°C et 70 % de HR) (Adams et al., 1982) et sur poliovirus (en 2 min à 20°C, à environ 72 % de HR) (De Jong et al., 1968). L'inactivation "quasi-instantanée" du rotavirus est importante (Ijaz et al., 1985b ; Sattar et al., 1984), mais avec un taux d'inactivation aux humidités relatives intermédiaires

(e.g. 50 %) plus faible qu'aux humidités extrêmes (30 et 80 %). D'autres travaux sur mengovirus, Maus Elberfeld virus, Col-SK virus, Simian virus 40 suggèrent une inactivation du même ordre de grandeur sans qu'on puisse la calculer précisément (Akers et al., 1966, 1968 et 1973). Pour des temps plus longs, l'inactivation croît avec la durée, les inactivations "quasi-instantanée" et cinétique aboutissant souvent à une inactivation globale faible aux HR>60 %, maximale aux HR entre 40 % et 60 %, et intermédiaire aux HR < 40 % ; ces observations ont été faites sur mycobactériophage D29 (Liu et al., 2012), reovirus (Adams et al., 1982), Mengovirus, Maus Elberfeld virus, Col-SK virus, Simian virus 40 (Akers et al., 1966, 1968 et 1973). Le niveau d'inactivation intermédiaire aux HR les plus faibles peut s'expliquer par la lenteur de la réponse virale à la teneur en eau. Sattar et al. (1984) et Ijaz et al. (1985b) travaillant sur rotavirus ont obtenu des résultats différents avec une inactivation minimale aux HR moyennes (50 %). De Mik et al. (1977) ont traité principalement de l'effet de l'O₃ sur l'inactivation des virus aérosolisés dans des gammes de concentrations en O₃ rencontrées *in situ* (de 0 à 110 ppb) , tandis que Tseng et Li (2006) ont travaillé sur des teneurs sortant des valeurs classiquement observées (de 100 à 10000 ppb). Dans la gamme environnementale, l'O₃ affecterait l'infectiosité des virus, la constante cinétique d'inactivation pour un modèle exponentiel augmentant jusqu'à des teneurs en O₃ de l'ordre de 30 à 60 ppb pour ensuite ne plus varier avec cette teneur. A ce stade il est difficile de savoir si l'O₃ agit directement sur les virus ou indirectement *via* la chimie de l'atmosphère ou des gouttelettes en suspension, comme l'illustrent les résultats obtenus par De Mik et al., (1977) sur les interactions entre O₃ et composés organiques volatils (cyclohexène ou trans-2-butène) affectant la concentration en O₃ elle-même et l'inactivation des virus.

Pour s'affranchir de difficultés (contaminations, quantité nécessaire de virus), quelques travaux ont porté sur le devenir de virus entériques de l'homme (ou de leurs modèles) exposés à des conditions atmosphériques après avoir été déposés sur des supports divers (Tableau II.6) (Bae et al., 2014 ; Hirneisen et Kniel, 2013 ; Cannon et al., 2013 ; Kim et al., 2012 ; Jean et al., 2011 ; Casanova et al., 2010 ; D'Souza et al. 2006 ; Stine et al., 2005 ; Kukavica-Ibrulj et al., 2004 ; Mbithi et al., 1991 ; Abad et al., 2001, 1994 ; Sattar et al., 1986 ; Moe et Shirley, 1982). Et plusieurs articles ont synthétisé les travaux sur ce sujet (Vasickova et al., 2010 ; Boone et Gerba, 2007). A notre connaissance, seuls Hirneisen et Kniel, (2013) et Girard et al., (2010) ont suivi parallèlement aux quantités de virus infectieux (norovirus murin et Tulane virus pour les premiers, et norovirus murin seulement pour les seconds) des quantités de génome viral (uniquement norovirus humain pour les premiers, auquel s'ajoutait le norovirus murin pour les seconds). Toutefois, les quantités de génomes n'ont pas été utilisées pour faire explicitement la part entre immobilisation sur le support et inactivation comme fait parfois en réacteurs fermés (Zhao et al., 2012). Quelques études ont traité de l'immobilisation de virus sur des supports variés après évaporation de la suspension d'apport : (i) sur acier inoxydable VHA (Kukavica-Ibrulj et al., 2004), norovirus (Girard et al., 2010 ; Sherer et al., 2009) et rotavirus (Sherer et al., 2009), (ii) sur céramique norovirus (Sherer et al., 2009) et rotavirus (Sherer et al., 2009), et (iii) sur polyéthylène VHA (Kukavica-Ibrulj et al., 2004), norovirus (Sherer et al., 2009) et rotavirus (Sherer et al., 2009). Le séchage a un effet majeur sur la rétention en jouant sur les distances entre particules virales et support solide et sur les forces à courte distance (Leckband et Israelachvili, 2001). En pratique pour une suspension d'apport à pH=7 soumise à évaporation pendant 15 min, la quantité de virus récupérés a varié sur acier inoxydable entre 15 et 28 % et entre 7 et 11 % respectivement pour le norovirus humain et le rotavirus bovin, sur céramique entre 31 et 52 % et entre 46 et 58 %, et sur polyéthylène entre 26 et 33 % et entre 15 et 39 % (Sherer et al., 2009). Pour un temps de séchage initial de 2 h, l'immobilisation peut provoquer une chute de la quantité de virus récupérés allant jusqu'à 3 log₁₀ sur acier inoxydable comme sur polyéthylène (Kukavica-Ibrulj et al., 2004), et les travaux de Girard et al. (2010) suggèrent par

ailleurs que les virus retenus le sont de plus en plus fortement en avançant dans le temps. Ainsi les travaux sur l'inactivation de virus après dépôt sur des surfaces sont difficilement exploitables sans prise en compte explicite de l'immobilisation tant que cette dernière n'est pas négligeable. En absence de traceur, certains auteurs ont toutefois distingué une phase initiale de « séchage » du dépôt au cours de laquelle aurait lieu l'essentiel de l'immobilisation et une phase ultérieure *a priori* plus marquée par l'inactivation. En rapportant les quantités de virus infectieux à plusieurs dates à la quantité de virus infectieux après cette phase de séchage, on peut alors décrire l'inactivation du virus dans les conditions testées. C'est ce qu'ont fait [Bae et al., \(2014\)](#), [Abad et al., \(1994\)](#), [Sattar et al., \(1986\)](#), [Mbithi et al. \(1991\)](#), [Moe et Shirley \(1982\)](#), [D'Souza et al. \(2006\)](#) et [Kim et al. \(2012\)](#) en considérant un séchage sous hotte à flux laminaire ou dans une enceinte ventilée respectivement 1 h, 3 à 5 h, et 3 h. Nous avons retraité les données de ces auteurs en considérant comme date initiale la première mesure après le séchage initial. Une erreur s'est glissée dans les calculs des taux de récupération de [Bae et al. \(2014\)](#) qui sont inférieurs à 1 % (au lieu de 61 %) pour du VHA déposé sur une céramique et récupéré après 1 h ; la diminution ultérieure très faible des quantités de VHA infectieux récupérés correspond à l'inactivation d'au maximum 0.056 log₁₀ par jour (à environ 20°C et à humidité relative ambiante). [Abad et al. \(1994\)](#) montrent que les cinétiques d'inactivation dépendent du virus (avec par ordre d'inactivation décroissante poliovirus (plus de 4 log₁₀ sur 3 jours) > rotavirus humain (entre 1.5 et 2.5 log₁₀) > VHA sur céramique (entre 0.5 et 1 log₁₀)), de l'humidité relative (avec par ordre d'inactivation décroissante, 50 % > 85 %), et « malheureusement » du support (avec par ordre d'inactivation décroissante, acier > céramique) avec toutefois des interactions entre ces variables (par exemple, quasiment pas de différence d'inactivation du VHA à 50 et 85 % d'humidité relative, alors que les écarts peuvent dépasser 1 log₁₀ pour le poliovirus sur acier). Comme déjà observé pour des virus en suspension en réacteur fermé, la vitesse d'inactivation du rotavirus est maximale aux humidités relatives élevées (environ 1.7 log₁₀ d'abattement par jour à 85 %), minimale aux humidités relatives intermédiaires (environ 0.065 log₁₀ d'abattement par jour à 50 %), et intermédiaire aux humidités relatives les plus faibles (environ 0.083 log₁₀ d'abattement par jour à 25 %) ([Sattar et al., 1986](#)).

Quelques études ont suivi l'inactivation des virus déposés sur des supports en présence de rayonnement. [Woo et al. \(2012\)](#) et [Jean et al. \(2011\)](#) ont travaillé hors contexte environnemental (UV C, rayonnements globaux très supérieurs au rayonnement solaire). A l'inverse, [Hirneisen et Kniel \(2013\)](#) et [Stine et al. \(2005\)](#) ont travaillé sur l'inactivation de virus déposés sur « plantes entières » dans des conditions proches des conditions naturelles. Ainsi [Stine et al. \(2005\)](#) trouvent des taux d'inactivation de 0.25 j⁻¹ et 0.29 j⁻¹ respectivement pour le VHA et le Calcivirus félin déposés sur laitues pour une humidité relative entre 86 et 90 %, et 0.09 et 0.12 j⁻¹ pour une humidité relative entre 45-48.4 %. Il est bien évidemment difficile de comparer ces résultats aux autres résultats concernant l'inactivation du VHA sur support, mais l'effet d'un rayonnement compatible avec un rayonnement environnemental n'est pas forcément démontré. Ce doute est renforcé par les travaux de [Hirneisen et Kniel \(2013\)](#) qui montrent qu'une lampe supplémentaire émettant des UV-A et UV-B n'avait pas d'effet sur l'inactivation du norovirus murin et du Tulane virus. Comme observé sur support inerte, les résultats dépendent de la variété de plante ([Hirneisen et Kniel, 2013](#)).

Tableau II.4 : Synthèse des conditions expérimentales testées avec des virus entériques dans la littérature en dispositif ouvert

Référence	Virus	Dispositif et protocole					Facteurs imposés			
		V. utile réacteur	Débit d'air	Temps de séjour	Aérosoliseur	Indicateur process*	T	HR**	UV-C (254 nm)	O ₃
		m ⁺³	(L.min ⁻¹)	s			(°C)	(%)**	J.m ⁻²	ppbv
McDevitt et al., 2012	Influenza virus (H1N1)	0.0036	25	8.6	Nébuliseur	-	-	25, 50, 81	4.9-15	-
McDevitt et al., 2007	Virus de la vaccine	0.0036	28	7.6	Nébuliseur	-	-	20, 60, 80	0.1-3.2	-
Walker et al., 2007	MS2 [£] Adenovirus	0.0034	12.5	16.2	Nébuliseur	-	-	27-82	6.0 et 26.1	-
Jensen, 1964	Coxsackie virus B1, Virus grippal (H1N1), Virus Sindbis, Virus de la vaccine, Adenovirus	0.022	2830- 5660 L.min ⁻¹	0.24-0.48	Nébuliseur	-	24-25	50-68	19.4	-

* : traceur/indicateur apporté en quantité connue ; ** : Humidité relative exprimée en % de l'humidité à pression de vapeur saturante. (-) : absence de données

£ : bacteriophage

Tableau II.5 : Synthèse des conditions expérimentales testées avec des virus entériques dans la littérature en dispositif fermé

Référence	Virus	Dispositif et protocole		Ventilation	Aérosolisateur	Indicateur process*	Facteurs imposés				Commentaires
		V. utile	Durée				T	HR**	UV-C	O ₃	
		réacteur m ⁺³	suivis min ⁻¹				(°C)	(%)**	J.m ⁻²		
Zhao et al., 2012	Gumboro Vaccine Virus	1.38	20	Ventillateur	pulvérisateur	ARN viral et uranine	10, 20, 30	40, 70	-	-	-
Liu et al., 2012	Myco-bactériophage D29 [£]	2.06	0-24 h	-	nébuliseur	-	25	25, 55, 85	-	-	-
Tseng et Li., 2006	MS2 [£] , φX174, φ6, et T7	0.023	13.4, 18.4 s	-	nébuliseur	-	25-28	55, 85	-	100-10000	-
Ijaz et al., 1985a	Coronavirus 229E et Poliovirus	0.3	0-24 h	tambour rotatif -	nébuliseur	-	6, 20	30, 50, 80	-	-	Parois en acier inoxydable
Ijaz et al., 1985b	Rotavirus bovin Poliovirus Type 1	0.3	2, 4, 8, 24 h	tambour rotatif	nébuliseur	-	20	30, 50, 80	-	-	Parois en acier inoxydable
Sattar et al., 1984	Rotavirus SA11	0.3	0.5-223 h	tambour rotatif	nébuliseur	rhodamine B	20	25, 50, 80	-	-	Parois en acier inoxydable
Adams et al., 1982	Reovirus	1	0.5-12 h	tambour rotatif	nébuliseur et atomiseur	Bacillus subtilis var. niger (spores)	21-24	25-95	-	-	Parois en acier inoxydable
Mik et al., 1977	φX174 [£]	0.05 et 2	30 min et <60 min	Petit ventilateur teflo	nébuliseur et atomiseur	Bacillus subtilis var. niger (spores)	20	70-95	-	0-110	Parois en verre (50L) et parois en acier

Akers et al., 1973	Simian Virus 40	1.6	5, 10, 15, 30, 60 min	tambour rotatif	atomiseur	-	21, 32	22-88	-	-	Parois métallique
Akers et al., 1968	Mengovirus 37A	1.6	15, 30, 60, 120 min	tambour rotatif	atomiseur	-	27	10-90	-	-	Parois métallique
De Jong et Winkler., 1968	Poliovirus type 1	2	0, 5, 15, 20, 30, 35, 60, 65 min	ventilateur	atomiser	-	20	15,45 - 71	-	-	-
Akers et al., 1966	Col-SK virus, Maus Elberfeld virus, Mengovirus	1.6	5 min – 6 h	tambour rotatif	atomiseur	-	16-26	5-95	-	-	Parois métallique

* : traceur/indicateur apporté en quantité connue ; ** : Humidité relative exprimée en % de l'humidité à pression de vapeur saturante ; (-) : absence de données

£ : bacteriophage

Tableau II.6 : Synthèse des conditions expérimentales testées avec des virus entériques dans la littérature sur support

Référence	Virus	Dispositif et protocole		Ventilation	Indicateur process*	Facteurs imposés				Commentaires
		Support	Durée suivis			T	HR**	UV-C	O ₃	
			min ⁻¹			(°C)	(%)**	J.m ⁻²	ppbv	
Bae et al., 2014	VHA	Acier inox Ceramique Verre Bois Plastique	0, 3, 12 et 24 h 3, 5, 7, 14, 21, 28 j	-	-	18-21°C		-	-	1 h de séchage
Cannon et al., 2013	Norovirus murin et Calicivirus félin	verre	18	-	-	-	70	-	19000-20000	L'ozone est produit par une lampe dans l'enceinte
Hirneisen et Kniel, 2013	Norovirus murin et virus Tulane	Feuille d'épinard	0-7 j	-	-	18	65	285 µE units.m ⁻² .s ⁻¹ (UVA/UVB) et/ou 150µE units.m ⁻² .s ⁻¹	-	
Kim et al., 2012	MS2 [£] , VHA, Norovirus murin	Bois Acier inoxydable	0-30 j	-	-	15, 25, 32, 40	30, 50, 70	-	-	
Woo et al., 2012	MS2 [£]	Masque chirurgical	0-2 h	2 L.min ⁻¹	-	20	30, 60, 90	254 nm 1 mW.cm ⁻²	-	La ventilation n'est présente que pendant la phase de fixation des virus (5 min) et non UV
Jean et al., 2011	Norovirus murin, VHA	Acier inox et PVC	0.1, 0.6, 1, 2 s	-	-			(200-1100 nm) 1.27 J.cm ⁻² par pulse	-	

(jusqu'à 6 pulse)									
Casanova et al., 2010	TGEV, Coronavirus murin	Acier inox	0-28 j	-	-	4, 20, 40	20, 50, 80	-	-
Girard et al., 2010	Norovirus murin et humain	Acier inox	10, 60 et 120 min	-	-	Température de la pièce	25, 80	-	-
D'Souza et al., 2006	Calicivirus félin	Formica, Céramique, acier inoxydable	30, 60, 120, 240, 480, 1 j, 2 j et 7 j	-	-	22	78-88	-	-
Stine et al., 2005	VHA, Calicivirus félin, Coliphage PRD1 [†]	Feuille de laitue, poivron, melon	0, 1, 3, 5, 7, 10, 14 j	-	-	18-26	85.7-90.3 45.1-48.4	(346-1003 nm) 300 W.m ⁻² (12 h.j ⁻¹)	-
Abad et al., 2001	Astrovirus humain, Polyovirus type 1, Adenovirus 40, VHA	Porcelaine et papier en cellulose	0-60 j	-	-	4, 20	90	-	-
Doultree et al., 1999	Calicivirus félin	Verre	0-55 j	-	-	4, 20, 37	-	-	-
Abad et al., 1994	Poliovirus type 1, Adenovirus entérique, Rotavirus humain, VHA	Papier et vêtement en coton, aluminium, porcelaine, carrelage, latex et polystyrène	0-60°j	-	-	4, 20	50, 85, 90	-	-
Mbith et al., 1991	VHA et poliovirus	acier inoxydable	0-96 h	-	-	5, 20, 35	25, 55, 80, 95	-	-

Présence du Norwalk virus comme traceur de RT-PCR

(TCID50)
(Nt/N0)=10^{-Kt}

ICRT-qPCR

Séchage de 5 h avant les conditions d'expérience

Sattar et al., 1986	Rotavirus humain	Acier inox, plastique rugeux, plastique lisse, verre, tissu en coton, carte postal, papier	0-12 j			4, 22	25, 50, 85		-	Séchage 3 h
Moe et Shirley., 1982	Rotavirus humain	verre	0-13 j	-	-	4, 20, 37	12-14, 33-34, 51-59, 75-76, 92-94	-	-	

* : traceur/indicateur apporté en quantité connue ; ** : Humidité relative exprimée en % de l'humidité à pression de vapeur saturante ; (-) : absence de donnée
£ : bacteriophage

II.5. Conclusion

On retrouve dans les eaux usées traitées des quantités de virus entériques de l'ordre de 10^2 - 10^5 gc.100mL⁻¹. Ces quantités varient suivant le traitement effectué en STEU, les virus étant faiblement éliminés par les traitements secondaires de type boue activée en STEU. La plupart sont des virus nus très résistants dans l'environnement ; ils peuvent y rester infectieux longtemps (plusieurs mois pour le VHA en milieu liquide). Lors de la réutilisation d'eaux usées, les virus entériques peuvent être aérosolisés lors de l'aspersion. Après aspersion, ils peuvent peut-être être aérosolisés à partir de la surface du sol ou des végétaux lors d'épisodes venteux mais, à notre connaissance, aucune étude n'avait traité du sujet. Une fois aérosolisés, l'inactivation des virus en suspension dans l'atmosphère va probablement dépendre de nombreux facteurs, dont leur spéciation (virus isolés, virus agrégés, virus adsorbés à la surface de colloïdes inertes pouvant être de nature diverses), et l'effet des conditions climatiques au sens physique (humidité et température de l'air, rayonnement solaire) et chimique (concentrations en composés oxydants notamment, dont l'O₃ n'est qu'un représentant). Si plusieurs études ont été entreprises sur l'inactivation des virus exposés directement à l'air, leurs résultats semblent très partiels et très dépendant du virus considérés. Parmi les résultats les plus nets, on note les effets combinés de la température et de l'humidité de l'air, avec toutefois des tendances et des ordres de grandeurs contrastés entre virus, voire entre auteurs pour un même virus. Très peu d'études ont porté sur les effets de rayonnements et de l'O₃ pour des conditions compatibles avec des contextes environnementaux. Il est donc important d'acquérir des données quantitatives sur les aspects aérosolisation et inactivation atmosphériques des virus afin d'évaluer *in fine* les risques pour des populations proches de zones de réutilisation des eaux usées ou à proximité de STEU ainsi que pour les agriculteurs utilisant les eaux usées en irrigation.

Références:

- Abad F.X., Villena C., Guix S., Caballero S., Pintó R.M., et Bosch A. 2001. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3904-3907.
- Abad F.X., Pinto R. M., et Bosch A. 1994. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3704-3710.
- Adams D.J., Spendlove J.C., Spendlove R.S., Barnett B.B., 1982. Aerosol stability of infectious and potentially infectious reovirus particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 903 –908.
- AFD. 2011. La réutilisation des eaux usées traitées (REUT). Eléments de méthodologie pour l’instruction de projets. Agence Française de Développement.VF26.
- AFSSA. 2008. Réutilisation des eaux usées traitées pour l’arrosage ou l’irrigation. 2001-SA-0075.
- Albinana-Gimenez N., Clemente Casares P., Bofill-Mas S., Hundesa A., Ribas F., et Girones R.. 2006. Distribution of Human Polyoma- viruses, Adenoviruses, and Hepatitis E Virus in the Environment and in a Drinking-Water Treatment Plant. *Env. Sci Technol.* Vol. 40, n°23, p. 7416-7422.
- Altmeyer N., Abadia G., Schmitt S., et Leprince A.. 1990. Risques microbiologiques et travail dans les stations d’épuration des eaux usées. Doc. Pour Médecin Trav. n°44.
- Angelakis A.N. 2012. Wastewater recycling and reuse in EU countries: necessity for Establishing EU Legislation. Workshop on the Quality of Recycled Water and its Application in Agriculture 27th. Dans : Cyprus Board of Limassol-Amathus (SBLA).
- Angelakis A.N., et Durham B. 2008. Water recycling and reuse in EUREAU countries: Trends and challenges. *Desalination.* Vol. 218, n°1-3, p. 3-12.
- Akers T.G., Prato C.M., et Dubovi, E.J. 1973. Airborne stability of simian virus 40. *Applied microbiology*, 26(2), 146-148.
- Akers T.G., Hatch M.T., 1968. Survival of a picornavirus and its infectious ribonucleic acid after aerosolization. *Appl. Microbiol.* 16, 1811–1813.
- Akers T.G., Bond S., Goldberg L.J., 1966. Effect of Temperature and Relative Humidity on Survival of Airborne Columbia SK Group Viruses. *Appl. Microbiol.* 14, 361–364.
- Asano T. 1998. Wastewater reclamation and reuse. *Water Quality Management Series* Volume 10, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Ausar S. F., Foubert T.R., Hudson M.H., Vedvick T.S., et Middaugh C.R. 2006. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles effect of pH and temperature. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19478-19488.
- Aussel H., Le Bâcle C. et Dornier G. 2004. Le point des connaissances sur le traitement des eaux usées. INRS.
- Bae S.C., Park S.Y., Kim A.N., Oh M.H., et Ha S.D. 2014. Survival of hepatitis A virus on various food-contact surfaces during 28 days of storage at room temperature. *Food Research International*, 64, 849-854.
- Barakat M.A., et Schmidt E. 2010. Polymer-enhanced ultrafiltration process for heavy metals removal from industrial wastewater. *Desalination.* Vol. 256, n°1-3, p. 90-93.
- Bates B.C., Kundzewicz Z.W., Wu S., Palutikof J.P. 2008. Climate Change and Water. *Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC Secretariat, Geneva, 210 pp.
- Baudart J., et Paniel N. 2014. Sources et devenir des micro-organismes pathogènes dans les environnements aquatiques. *Rev. Francoph. Lab.* Vol. 2014, n°459, p. 29-39.
- Bauer H., Fuerhacker M., Zibuschka F., Schmid H., et Puxbaum H. 2002. Bacteria and fungi in aerosols generated by two different types of wastewater treatment plants. *Water Res.* Vol. 36, n°16, p. 3965-3970.
- Baumont S., Camard J.P., Lefranc A., et Franconi A. 2004. Réutilisation des eaux usées épurées : risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France.
- Baumont S. 2002. Réutilisation des eaux usées épurées : risques sanitaires et faisabilités en île de France. Observatoire régional de santé île de France Institut d’aménagement et d’urbanisme de la région ILF.

- Bausum H. T., Schaub S. A., Kenyon K. F., et Small M. J. 1982. Comparison of coliphage and bacterial aerosols at a wastewater spray irrigation site. *Applied and environmental microbiology*, 43(1), 28-38.
- Bertrand I., Schijven J. F., Sánchez G., Wyn-Jones P., Ottoson J., Morin T., Muscillo M., Verani M., Nasser A., de Roda Husman A. M., Myrmet M., Sellwood J., Cook N., et Gantzer C.. 2012. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J.Appl. Microbiol.*
- Bitton G. 2005. *Wastewater microbiology*. John Wiley & Sons.
- Bixio D., Thoeye C., De Koning J., Joksimovic D., Savic D., Wintgens T., et Melin T.. 2006. Wastewater reuse in Europe. *Desalination*. Vol. 187, n°1-3, p. 89-101.
- Bixio D., Thoeye C., Wintgens T., Ravazzini A., Miska V., Muston M., Chikurel H., Aharoni A., Joksimovic D., et Melin T.. 2008. Water reclamation and reuse: implementation and management issues. *Desalination*. Vol. 218, n°1-3, p. 13-23.
- Bofill-Mas S., Albinana-Gimenez N, Clemente-Casares P, Hundesa A, Rodriguez-Manzano J, Allard A, Calvo M, Girones R. 2006. Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices. *Applied and Environmental Microbiology* 72:7894 –7896.
- Boone S. A., et Gerba C.P. 2007. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1687-1696.
- Brissaud F. 2003. Groundwater recharge with recycled municipal wastewater: criteria for health related guidelines. State of the art report health risks in aquifer recharge using reclaimed water Water, Sanitation and Health Protection and the Human Environment World Health Organization Geneva and WHO Regional Office for Europe Copenhagen, Denmark 2:10-15.
- Brooks J. P., Tanner B. D., Gerba C. P., Haas C. N., et Pepper I. L. 2005. Estimation of bioaerosol risk of infection to residents adjacent to a land applied biosolids site using an empirically derived transport model. *Journal of applied microbiology*, 98(2), 397-405.
- Brown A., et Matlock M.D. 2011. A review of water scarcity indices and methodologies. Sustain. Consort. White Pap. n°106, p. 19.
- Burrows S. M., Elbert W., Lawrence M. G., et Pöschl U.. 2009. Bacteria in the global atmosphere – Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems. *Atmospheric Chem. Phys.* Vol. 9, n°23, p. 9263-9280.
- CAC/GL 79-2012. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food. Codex alimentarius. International Food Standards.
- Cannon J. L., Kotwal G., et Wang Q. 2013. Inactivation of Norovirus Surrogates after Exposure to Atmospheric Ozone. *Ozone: Science & Engineering*, 35(3), 217-219.
- Carducci A., Tozzi E., Rubulotta E., Casini B., Cantiani L., Rovini E., Muscillo M., et Pacini R.. 2000. Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment. *Water Res.* Vol. 34, n°4, p. 1173-1178.
- Carducci A., Arrighi S., Ruschi A. 1995. Detection of coliphages and enteroviruses in sewage and aerosol from an activated sludge wastewater treatment plant. *Letters in Applied Microbiology* 21, 207-209.
- Casal J., Planas-Cuchí E., Moreso J.M., et Casal J.. 1995. Forecasting virus atmospherical dispersion. Studies with foot-and-mouth disease. *J. Hazard. Mater.* Vol. 43, n°3, p. 229-244.
- Casanova L.M., Jeon S., Rutala W. A., Weber D. J., et Sobsey M. D. 2010. Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 76(9), 2712-2717.
- Chigor V.N., et Okoh, A. I. 2012. Quantitative RT-PCR detection of hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Buffalo River and source water dams in the Eastern Cape Province of South Africa. *International journal of environmental research and public health*, 9(11), 4017-4032.
- Coakley S.M, et Scherm H. 1996. Plant disease in a changing global environment. *Asp. Appl. Biol.*
- Cook N., et D’Agostino M. 2013. Prevalence and control of hepatitis A virus in fresh produce. *Food Borne Viruses and Prions and Their Significance for Public Health*, 169.

- Costafreda M.I., Bosch A., Pintó R.M. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 804-810.
- Craun G.F., Brunkard J.M., Yoder J.S., Roberts V.A., Carpenter J., Wade T., Calderon R.L., Roberts J.M., Beach M.J., Roy S.L. 2010. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 507-528.
- CSHPPF. 1991. Recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène publique de France relatives à l'utilisation des eaux usées épurées pour l'irrigation des cultures et l'arrosage des espaces verts. Conseil Supérieur d'Hygiène publique de France.
- Cuthbert J.A. 2001. Hepatitis A: old and new. *Clin. Microbiol. Rev.* Vol. 14, n°1, p. 38-58.
- Deboosere N., Pinon A., Caudrelier Y., Delobel A., Merle G., Perelle S., Temmam S., Loutreul J., Morin T., Estienney M., Belliot G., Pothier P., Gantzer C., et Vialette M. 2012. Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. *Food Microbiol.*
- De Jong J.C., et Winkler K.C. 1968. The inactivation of poliovirus in aerosols. *Journal of Hygiene*, 66(04), 557-565.
- De Mik G., de Groot I., et Gerbrandy J.L.F. 1977. Survival of aerosolized bacteriophage ϕ X174 in air containing ozone-olefin mixtures. *Journal of Hygiene*, 78(02), 189-198.
- DiCaprio E., Culbertson D., Li J. 2015. Evidence of the internalization of animal caliciviruses via the root of growing strawberry plants and dissemination to the fruit. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-03867.
- Doultree J.C., Druce J.D., Birch C.J., Bowden D.S., et Marshall J.A. 1999. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *Journal of Hospital Infection*, 41(1), 51-57.
- Drechsel P., et Evans A.E.V.. 2010. Wastewater use in irrigated agriculture. *Irrig. Drain. Syst.* Vol. 24, n°1-2, p. 1-3.
- D'Souza D.H., Sair A., Williams K., Papafragkou E., Jean J., Moore C., et Jaykus L. 2006. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *International journal of food microbiology*, 108(1), 84-91.
- Duizer E., Bijkerk P., Rockx B., de Groot A., Twisk F., et Koopmans M.. 2004. Inactivation of Caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 70, n°8, p. 4538-4543.
- Dungan R.S. 2010. BOARD-INVITED REVIEW: Fate and transport of bioaerosols associated with livestock operations and manures. *J. Anim. Sci.* Vol. 88, n°11, p. 3693 -3706.
- Du Pisani P.L. 2006. Direct reclamation of potable water at Windhoek's Goreangab reclamation plant. *Desalination*. Vol. 188, n°1-3, p. 79-88.
- Dupont S., Brunet Y., et Jarosz N.. 2006. Eulerian modelling of pollen dispersal over heterogeneous vegetation canopies. *Agric. For. Meteorol.* Vol. 141, n°2-4, p. 82-104.
- Ensink J.H.J., Van der Hoek W. 2006. Raw wastewater use in agriculture; risk versus benefits. In *Health Impact Assessment for Sustainable Water Management Edited by Lorna Fewtrell and David Kay*. Published by IWA Publishing, London, UK, Chapter 10, pp. 233-248.
- FAO et OAA. 2011. The state of the world's land and water resources for food and agriculture: managing systems at risk. 1st ed. Milton Park, Abingdon ; New York, NY : Earthscan, 285 p. ISBN : 184971326X.
- Flannery J., Keaveney S., Rajko-Nenow P., O'Flaherty V., et Doré W. 2012. Concentration of norovirus during wastewater treatment and its impact on oyster contamination. *Applied and environmental microbiology*, 78(9), 3400-3406.
- Fracchia L., Pietronave S., Rinaldi M., Martinotti M.G. 2006. Site-related airborne biological hazard and seasonal variations in two wastewater treatment plants. *Water Research* 40, 1985-1994.
- Fujioka R.S., et Yoneyama B.S. 2002. Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* Vol. 46, n°11-12, p. 291-295.
- Fujioka R., Kurtz H., et Ackermann W.W.. 1969. Effects of Cations and Organic Compounds on Inactivation of Poliovirus with Urea, Guanidine, and Heat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* Vol. 132, n°3, p. 825-829.

- Gantzer C, Dubois É., Crance J-M., Billaudel S., Kopecka H., Schwartzbrod L., Pommepuy M., Guyader FL. 1998. Devenir des virus entériques en mer et influence des facteurs environnementaux. *Oceanologica Acta* 21:983–992.
- Genetet N. 2002. Immunologie. Londres; Paris; New York (N.Y.); Cachan : Tec & Doc ; *Éd. médicales internationales*, ISBN : 2743005289 9782743005283.
- Gerba C.P., et Smith J.E Jr. 2005. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J. Environ. Qual.* Vol. 34, n°1, p. 42-48.
- Gerba C.P., Gramos D.M., et Nwachuku N.. 2002. Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 68, n°10, p. 5167-5169.
- Giungato P., Nardone E., Notarnicola L. 2010. Reclamation of treated wastewater in the Apulia région (Italy): state of the art and future perspectives. *J. Commodity Sci. Technol. Quality* 49, 105-120.
- Girard M., Ngazoa S., Mattison K., et Jean J. 2010. Attachment of noroviruses to stainless steel and their inactivation, using household disinfectants. *Journal of Food Protection®*, 73(2), 400-404.
- Graedel T.E., et Crutzen P.J. 1992 Atmospheric change. An earth system perspective. *W.H. Freeman and Company*, New York.
- Grisoli P., Rodolfi M., Villani S., Grignani E., Cottica D., Berri A., Picco A.M., et Dacarro C. 2009. Assessment of airborne microorganism contamination in an industrial area characterized by an open composting facility and a wastewater treatment plant. *Environ. Res.* Vol. 109, n°2, p. 135-142.
- Hanafiah K.M., Jacobsen K.H., et Wiersma S.T.. 2011. Challenges to mapping the health risk of hepatitis A virus infection. *Int. J. Health Geogr.* Vol. 10, n°1, p. 57.
- Harper D. R. 2012. Viruses: biology, applications, control. New York : Garland Science, 324 p. ISBN : 9780815341505.
- Heinonen-Tanski H., Reponen T., et Koivunen J.. 2009. Airborne enteric coliphages and bacteria in sewage treatment plants. *Water Res.* Vol. 43, n°9, p. 2558-2566.
- Hirneisen K. A., et Kniel, K. E. 2013. Norovirus surrogate survival on spinach during preharvest growth. *Phytopathology*, 103(4), 389-394.
- Herbold K., Flehmig B., et Botzenhart K.. 1989. Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 55, n°11, p. 2949 -2953.
- Hewitt J., Leonard M., Greening G.E. et Lewis G.D. 2011. Influence of wastewater treatment process and the population size on human virus profiles in wastewater. *Water Res.* Vol. 45, n°18, p. 6267-6276.
- Hoffman, R., Marshall M.M., Gibson M.C., et Rochelle P. A. 2009. Prioritizing Pathogens for Potential Future Regulation in Drinking Water. *Env. Sci Technol.* Vol. 43, n°14, p. 5165-5170.
- Hollinger, B.F., et Emerson S.U.. 2007. Hepatitis A Virus . Dans : Fields Virol. Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Holmes, N.S., et L. Morawska. 2006. A review of dispersion modelling and its application to the dispersion of particles: An overview of different dispersion models available. *Atmos. Environ.* Vol. 40, n°30, p. 5902 -5928.
- Iglesias, R., E. Ortega, G. Batanero, et L. Quintas. 2010. Water reuse in Spain: Data overview and costs estimation of suitable treatment trains . *Desalination.* Vol. 263, n°1-3, p. 1-10.
- Ijaz M. K., Brunner A. H., Sattar S. A., Nair R. C., et Johnson-Lussenburg C. M. 1985a. Survival characteristics of airborne human coronavirus 229E. *Journal of General Virology*, 66(12), 2743-2748.
- Ijaz M.K., Sattar S.A., Johnson-Lussenburg C.M., Springthorpe V.S., 1985b. Comparison of the airborne survival of calf rotavirus and poliovirus type 1 (Sabin) aerosolized as a mixture. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 289–293.
- IPCC. 2013. Summary for Policymakers . Dans : Clim. Change 2013 Phys. Sci. Basis Contrib. Work. Group Fifth Assess. Rep. Intergov. *Panel Clim. Change.* p. 33. ISBN : 9781107661820.
- Jacobsen K.H., et Wiersma S.T. 2010. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine.* Vol. 28, n°41, p. 6653-6657.

- Jean J., Morales-Rayas R., Anoman M.N., et Lamhoujeb S. 2011. Inactivation of hepatitis A virus and Norovirus surrogate in suspension and on food-contact surfaces using pulsed UV light (pulsed light inactivation of food-borne viruses). *Food Microbiol.* Vol. 28, n°3, p. 568-572.
- Jensen M. M. 1964. Inactivation of airborne viruses by ultraviolet irradiation. *Applied microbiology*, 12(5), 418-420.
- Jiménez B., Drechsel P., Koné D., Bahri A., Raschid-Sally L., Qadir M. 2010. Wastewater, sludge and excreta use in developing countries: an overview. In: *Wastewater Irrigation and Health Assessing and Mitigating Risk in Low-Income Countries* (Drechsel P., Scott C.A., Raschid-Sally L., Redwood M., Bahri A. eds.), 3-27.
- Jiménez-Cisneros, B., et Chávez-Mejía A. 1997. Treatment of Mexico City Wastewater for Irrigation Purposes. *Environ. Technol.* Vol. 18, n°7, p. 721-729.
- JORF. 2012. Arrêté du 2 août 2010 relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts. AFSP1410752A.
- . 2014. Arrêté du 25 juin 2014 modifiant l'arrêté du 2 août 2010 relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts. 0153AFSP1410752A.
- Kamel A.H., Ali M.A., El-Nady H.G., Deraz A., Aho S., Pothier P., et Belliot G.. 2011. Presence of enteric hepatitis viruses in the sewage and population of Greater Cairo: Research Notes. *Clin. Microbiol. Infect.* Vol. 17, n°8, p. 1182-1185.
- Katzenelson, E., et Kedmi S.. 1979. Unsuitability of polioviruses as indicators of virological quality of water. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 37, n°2, p. 343-344.
- Katzenelson, E., et Teltch, B. 1976. Dispersion of enteric bacteria by spray irrigation. *Water Pollution Control Federation*, 710-716.
- Kennedy C., Baker L., Dhakal S., Ramaswami A. 2012. Sustainable urban systems: an integrated approach. *Journal of Industrial Ecology* 16, 775-779.
- Keraïta B., Jiménez B., Drechsel P. 2008. Extent and implications of agricultural reuse of untreated, partly treated and diluted wastewater in developing countries. *CAB reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources* 3, 1-15.
- Khuder S. A., Arthur T., Bisesi M. S., et Schaub E. A. 1998. Prevalence of infectious diseases and associated symptoms in wastewater treatment workers. *American journal of industrial medicine*, 33(6), 571-577.
- Kim, S. J., Si J., Lee J. E., et Ko G. 2012) Temperature and humidity influences on inactivation kinetics of enteric viruses on surfaces. *Environmental science & technology*, 46(24), 13303-13310.
- Kim, S.W., Ramakrishnan, M.A., Raynor, P.C., Goyal, S.M., 2007. Effects of humidity and other factors on the generation and sampling of a coronavirus aerosol. *Aerobiologia* 23, 239-248. doi:10.1007/s10453-007-9068-9
- Knipe D.M., et Howley P.M. 2007. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, 1650 p. ISBN : 9780781760607.
- Koopmans M., Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology* 90, 23-41.
- Koopmans, M., Bonsdorff C.-H., Vinjé J., Medici D., et Monroe S.. 2002. Foodborne viruses1 . *FEMS Microbiol. Rev.* Vol. 26, n°2, p. 187-205.
- Kukavica-Ibrulj, I., Darveau A., Jean J., et Fliss I. 2004. Hepatitis A virus attachment to agri-food surfaces using immunological, virological and thermodynamic assays. *Journal of applied microbiology*, 97(5), 923-934.
- La Rosa G., Marta F., Libera S.D., Iaconelli M., et Muscillo M. 2013. Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission. *Ann. Dell'Istituto Super. Sanità*.
- La Rosa G., Pourshaban M., Iaconelli M., Muscillo M. 2010. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali del l'Istituto superiore di sanità* 46, 266-273.

- La Scola, B., Desnues C., Pagnier I., Robert C., Barrassi L., Fournous G., Merchat M., Suzan-Monti M., Forterre P., Koonin E., et Raoult D.. 2008. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature*. Vol. 455, n°7209, p. 100-104.
- Lazarova V., Liechti P.A., Savoye P., et Hausler R. 2013. Ozone disinfection: main parameters for process design in wastewater treatment and reuse. *J. Water Reuse Desalination*. Vol. 3, n°4, p. 337.
- Lazarova V., et Brissaud F.. 2007. Intérêt, bénéfices et contraintes de la réutilisation des eaux usées en France. *EAU Ind. Nuis.* n°299, p. 23-39.
- Lazarova V. 2004. Wastewater treatment for water recycling. In *"Water Reuse for Irrigation ; Agriculture, Landscapes, and Turf Grass"* (V. Lazarova, A. Bahri Eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida, 163-234.
- Le Cann P., Ranarijaona S., Monpoeho S., Le Guyader F., et Ferré V. 2004. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Research in Microbiology*, 155(1), 11-15.
- Leckband D., et Israelachvili J. 2001. Intermolecular forces in biology. *Quarterly reviews of biophysics*, 34(02), 105-267.
- Le Guyader F.S., Ollivier J.J., Le Saux J.C, et Garry P. 2014. Les virus entériques humains et l'eau. *Rev. Francoph. Lab.* Vol. 2014, n°459, p. 41-49.
- Le Guyader FS, Atmar RL, Le Pendu J. 2012. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. *Curr Opin Virol* 2:103–110.
- Lente I., Keraita B., Drechsel P., Ofosu-Anim J., et Brimah A.K. 2012. Risk Assessment of Heavy-Metal Contamination on Vegetables Grown in Long-Term Wastewater Irrigated Urban Farming Sites in Accra, Ghana. *Water Qual. Expo. Health*. Vol. 4, n°4, p. 179-186.
- Leverenz H.L., Tchobanoglous G., et Asano T. 2011. Direct potable reuse: a future imperative. *J. Water Reuse Desalination*. Vol. 1, n°1, p. 2.
- Lin Y.C., et Wu S.C.. 2006. Effects of ozone exposure on inactivation of intra- and extracellular enterovirus 71. *Antiviral Res.* Vol. 70, n°3, p. 147-153.
- Lodder W. J., Van Den Berg, H.H.J.L., Rutjes, S. A., et de Roda Husman, A. M. 2010. Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in The Netherlands. *Applied and environmental microbiology*, 76(17), 5965-5971.
- Lwoff A., T. F. Anderson, et F. Jacob. 1959. Remarks on the characteristics of the infectious viral particle. *Ann. Inst. Pasteur*. Vol. 97, p. 281-289.
- Lwoff A. 1953. LYSOGENY . *Bacteriol. Rev.* Vol. 17, n°4, p. 269-337.
- Mara D.D., Sleigh P.A., Blumenthal U.J., Carr R.M. 2007. Health risks in wastewater irrigation: Comparing estimates from quantitative microbial risk analyses and epidemiological studies. *Journal of Water and Health* 5, 39-50.
- Marks P.J., Vipond I.B., Carlisle D., Deakin D., Fey R.E., Caul E.O. 2000. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiology and Infection* 124, 481-487.
- Marks P.J., Vipond I.B., Regan F.M., Wedgwood K., Fey R.E., Caul E.O. 2003. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiology and infection* 131, 727-736.
- Masclaux F.G., Hotz P., Gashi D., Savova-Bianchi D., Oppliger A. 2014. Assessment of airborne virus contamination in wastewater treatment plants. *Environmental Research* 133, 260-265.
- Matthias-Maser S., Obolkin V., Khodzer T., et Jaenicke R.. 2000. Seasonal variation of primary biological aerosol particles in the remote continental region of Lake Baikal/Siberia. *Atmos. Environ.* Vol. 34, n°22, p. 3805-3811.
- Mazzini R., L. Pedrazzi, et Lazarova V. 2013. Production of high quality recycled water for agricultural irrigation in Milan. Dans : Milest. Water Reuse Best Success Stories.
- Mbithi J. N., Springthorpe V. S., et Sattar S. A. 1991. Effect of relative humidity and air temperature on survival of hepatitis A virus on environmental surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), 1394-1399.

- McDevitt J.J., Lai K.M., Rudnick S.N., Houseman E.A., First M.W., Milton D.K., 2007. Characterization of UVC Light Sensitivity of Vaccinia Virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5760–5766. doi:10.1128/AEM.00110-07
- McDevitt J.J., Rudnick S.N., Radonovich L.J., 2012. Aerosol Susceptibility of Influenza Virus to UV-C Light. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1666–1669. doi:10.1128/AEM.06960-11
- Metcalf T.G., Melnick J.L., Estes M.K. 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology* 49, 461-87.
- Mik G., de Groot I., Gerbrandy J.L., 1977. Survival of aerosolized bacteriophage phi X174 in air containing ozone-olefin mixtures. *J. Hyg. (Lond.)* 78, 189–198.
- Moe K., et Shirley J. A. 1982. The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. *Archives of virology*, 72(3), 179-186.
- Molle B., Brelle F., Bessy J., et Gatel D. 2012. Which water quality for which uses? Overcoming over-zealous use of the precautionary principle to reclaim wastewater for appropriate irrigation uses: which reclaimed water quality for which uses in irrigation? *Irrig. Drain.* Vol. 61, p. 87-94.
- Morris C. E., Leyronas C., et Nicot, P. C. 2014. Movement of Bioaerosols in the Atmosphere and the Consequences for Climate and Microbial Evolution. *Aerosol Science: Technology and Applications*, 393-415.
- Nasser A.M., et Oman S.D. 1999. Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Res.* Vol. 33, n°7, p. 1748-1752.
- Nazaroff W.W. 2011. Norovirus, gastroenteritis, and indoor environmental quality. *Indoor Air* 21, 353-356.
- Nenonen N.P., Hannoun C., Svensson L., Torén K., Andersson L.M., Westin J., Bergström T. 2014. Norovirus GII. 4 detection in environmental samples from patient rooms during nosocomial outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 2352-2358.
- Pachepsky Y., Shelton D.R., McLain J.E.T., Patel J., Mandrell R.E. 2011. Irrigation as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. *Advances in Agronomy* 113 (Chapter two), 73-138.
- Papaiakovou I., Soupilas T., Angelakis A. 2011. Wastewater recycling and reuse for irrigation in EU(REAU) countries: Agricultural and Landscape Cases in Greece & Cyprus. Water recycling in EUREAU Countries, Barcelona, Spain, 28 September, 2011
- Paquerot S. 2007. Ressources en eau : les différentes facettes des conflits internationaux. Disponible sur : < <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/9323> > (Consulté le 22 octobre 2014).
- Paranychianakis N.V., Salgot M., et Angelakis A.N. 2010. Irrigation with Recycled Water: Guidelines and Regulations Dans : Levy GJ, Fine P, Bar-Tal A (éd.). *Treat. Wastewater Agric.* Oxford, UK : Wiley-Blackwell, p. 77-112.
- Petrinca A.R., Donia D., Pierangeli A., Gabrieli R., Degener A.M., Bonanni E., Diaco L., Cecchini G., Anastasi P., Divizia M. 2009. Presence and environmental circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1608-1617.
- Petterson S.R., Ashbolt N., Sharma A. 2001. Microbial risks from wastewater irrigation of salad crops: A screening-level risk assessment. *Water Environ. Res.* 72, 667–672.
- Phelps D.K., Rossky P.J., Post C.B. 1995. Influence of an antiviral compound on the temperature dependence of viral protein flexibility and packing: a molecular dynamics study. *J Mol Biol* 254, 544–551.
- Pinto R.M., Costafreda M.I., et Bosch A. 2009. Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A . *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 75, n°23, p. 7350-7355.
- Prevost B., Lucas F. S., Goncalves A., Richard F., Moulin L., et Wurtzer, S. 2015. Large scale survey of enteric viruses in river and waste water underlines the health status of the local population. *Environment international*, 79, 42-50.
- Pusch D., Oh D.Y., Wolf S., Dumke R., Schröter-Bobsin U., Höhne M., Schreier E. 2005. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of virology* 150, 929-947.
- Qadir Manzoor, Bahri A., Sato T., et Al-Karadsheh E. 2010. Wastewater production, treatment, and irrigation in Middle East and North Africa. *Irrig. Drain. Syst.* Vol. 24, n°1, p. 37-51.

- Renault P. 2014. Wastewater quality and required water quality for irrigation purposes. (Climate-KIC).
- Reynolds, K.A., Mena K.D, et Gerba C.P. 2008. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States . *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 192, p. 117–158.
- Rodríguez-Lázaro D, Cook N., Ruggeri F.M, Sellwood J., Nasser A., Nascimento M.S.J, D’Agostino M., Santos R., Saiz J.C, Rzeżutka A., Bosch A., Gironés R., Carducci A., Muscillo M., Kovač K., Diez-Valcarce M., Vantarakis A., Bonsdorff C-H., Roda Husman A.M., Hernández M., Poel W.H.M. 2012. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiology Reviews* 36:786–814.
- Rule Wigginton K., Menin L., Paz Montoya J., et Kohn T. 2010. Oxidation of Virus Proteins during UV254 and Singlet Oxygen Mediated Inactivation. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 44, n°14, p. 5437-5443.
- Sano D., Ohta T., Nakamura A., Nakagomi T., Nakagomi O., et Okabe S. 2015. Culture-Independent Evaluation of Nonenveloped-Virus Infectivity Reduced by Free-Chlorine Disinfection. *Applied and environmental microbiology*, 81(8), 2819-2826.
- Salgot M., C. Vergés et A.N. Angelakis. 2003. Risk assessment in wastewater recycling and reuse . *Water Recycl. Mediterr. Reg.* Vol. 3, n°4, p. 301-309.
- Sánchez-Monedero M.A., Aguilar M.I., Fenoll R., et Roig A. 2008. Effect of the aeration system on the levels of airborne microorganisms generated at wastewater treatment plants. *Water Res.* Vol. 42, n°14, p. 3739-3744.
- Sattar S.A., Ijaz M.K., Johnson-Lussenburg C.M., Springthorpe V.S., 1984. Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 879–881.
- Scheierling S. M., Bartone C.R., Mara D.D., et Drechsel P. 2011. Towards an agenda for improving wastewater use in agriculture. *Water International*, 36(4), 420-440.
- Scherer K., Mäde D., Ellerbroek L., Schulenburg J., Johne R., et Klein G. 2009. Application of a swab sampling method for the detection of norovirus and rotavirus on artificially contaminated food and environmental surfaces. *Food and Environmental Virology*, 1(1), 42-49.
- Scott C.A., Drechsel P., Raschid-Sally L., Bahri A., Mara D., Redwood M., et Jiménez B. 2010. Wastewater irrigation and health: challenges and outlook for mitigating risks in low-income countries. *Astewater Irrig.* p. 381.
- Scott C.A., Zarazúa J.A., et Levine G. 2000. Urban-wastewater reuse for crop production in the water-short Guanajuato river basin, Mexico. IWMI.
- Sidhu J.P.S., et Toze S.G. 2009. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environ. Int.* Vol. 35, n°1, p. 187-201.
- Shuval H. I., Guttman-Bass N., Applebaum, J., et Fattal B. 1989. Aerosolized enteric bacteria and viruses generated by spray irrigation of wastewater. *Water Science & Technology*, 21(3), 131-135.
- Sous-comité fédéral-provincial sur l’eau potable. 1996. Recommandations pour la qualité de l’eau potable au Canada. Ottawa : Santé Canada, ISBN : 0660951436 9780660951430.
- Sou/Dakouré M.Y., Mermoud A., Yacouba H., Boivin P. 2013. Impacts of irrigation with industrial treated wastewater on soil properties. *Geoderma* 200-201:31–39.
- Stellacci P., Liberti L., Notarnicola M., et Haas C. N. 2010. Hygienic sustainability of site location of wastewater treatment plants: a case study. II. Estimating airborne biological hazard. *Desalination*, 253(1), 106-111.
- Strazynski M. 2002. Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* Vol. 74, n°1-2, p. 73-78.
- Stine S.W., Song I., Choi C.Y., et Gerba C.P. 2005. Effect of relative humidity on preharvest survival of bacterial and viral pathogens on the surface of cantaloupe, lettuce, and bell peppers. *Journal of Food Protection®*, 68(7), 1352-1358.
- Sultan B., Labadi K., Guégan J.F., et Janicot S.. 2005. Climate Drives the Meningitis Epidemics Onset in West Africa. *PLoS Med.* Vol. 2, n°1, p. e6.
- Symonds E.M., Griffin D.W., et Breitbart M. 2009. Eukaryotic Viruses in Wastewater Samples from the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 75, n°5, p. 1402-140.
- Taylor R.G. et al. 2012. Ground water and climate change. *Nature Climate Change*, published online.

- Thurston-Enriquez J.A., Haas C.N., Jacangelo J., et Gerba C.P.. 2005. Inactivation of Enteric Adenovirus and Feline Calicivirus by Chlorine Dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 71, n°6, p. 3100-3105.
- Thurston-Enriquez J.A., Haas C.N., Jacangelo J., Riley K., et Gerba C.P. 2003. Inactivation of Feline Calicivirus and Adenovirus Type 40 by UV Radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 69, n°1, p. 577 -582.
- Tseng C.-C., Li C.-S., 2006. Ozone for inactivation of aerosolized bacteriophages. *Aerosol Sci. Technol.* 40, 683–689. doi:10.1080/02786820600796590
- Tulet P. 2005. ORILAM, a three-moment lognormal aerosol scheme for mesoscale atmospheric model: Online coupling into the Meso-NH-C model and validation on the Escompte campaign. *J. Geophys. Res.*
- Urbanucci A., Myrmel M., Berg I., Von Bonsdorff C. H., et Maunula L. 2009. Potential internalisation of caliciviruses in lettuce. *International journal of food microbiology*, 135(2), 175-178.
- US-EPA/US-AID. 2012. Guidelines for water reuse. US-EPA/US-AID.
- Van den Berg H., Lodder W., Van der Poel W., Vennema H., de Roda Husman A.M. 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Research in Microbiology* 156, 532-540.
- Van der Bruggen B. 2010. The global water recycling situation. *Sustainability Science and Engineering*, 2, 41-62.
- Vasickova P., Pavlik I., Verani M., et Carducci, A. 2010. Issues concerning survival of viruses on surfaces. *Food and Environmental Virology*, 2(1), 24-34.
- Vaughan G., Rossi L.M.G., Forbi J. C., de Paula V. S., Purdy M. A., Xia G., et Khudyakov Y. E. 2014. Hepatitis A virus: host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infection, Genetics and Evolution*, 21, 227-243.
- Verbyla ME, Mihelcic JR. 2015. A review of virus removal in wastewater treatment pond systems. *Water Research* 71:107–124.
- Villar L.M., De Paula V.S., Diniz-Mendes L., Guimarães F.R., Ferreira F.F.M., Shubo T.C., Miagostovich M.P., Lampe E., et Gaspar A.M.C.. 2007. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* Vol. 45, n°2, p. 168-173.
- Vogel H., Pauling A., et Vogel B. 2008. Numerical simulation of birch pollen dispersion with an operational weather forecast system. *Int. J. Biometeorol.* Vol. 52, n°8, p. 805-814.
- Vörösmarty C.J., McIntyre P.B., Gessner M.O., Dudgeon D., Prusevich A., Green P., et Davies, P.M. 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*, 467(7315), 555-561.
- Walker C.M., Ko G., 2007. Effect of Ultraviolet Germicidal Irradiation on Viral Aerosols. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5460–5465.
- Walter, M.V., Marthi B., Fieland V.P., et Ganio L.M.. 1990. Effect of aerosolization on subsequent bacterial survival. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 56, n°11, p. 3468-3472.
- Wéry N., C. Monteil A.M. Pourcher, et J.J. Godon. 2010. Human-specific fecal bacteria in wastewater treatment plant effluents. *Water Res.* Vol. 44, n°6, p. 1873-1883.
- WHO 2006. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Geneva: WHO (World Health Organization).
- WHO 1989. Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture; measures for public health protection. Geneva: WHO (World Health Organization).
- Woo M.-H., Grippin, A., Anwar, D., Smith, T., Wu, C.-Y., Wander, J.D., 2012. Effects of Relative Humidity and Spraying Medium on UV Decontamination of Filters Loaded with Viral Aerosols. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 5781–5787. doi:10.1128/AEM.00465-12
- Zhao Y., Aarnink A.J.A., Dijkman R., Fabri T., De Jong M.C.M., Groot Koerkamp P.W.G., 2012. Effects of Temperature, Relative Humidity, Absolute Humidity, and Evaporation Potential on Survival of Airborne Gumboro Vaccine Virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1048–1054. doi:10.1128/AEM.06477-11
- Zhang X., S. Sun, Y. Xiang, J. Wong, T. Klose, D. Raoult, et M.G. Rossmann. 2012. Structure of Sputnik, a virophage, at 3.5-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 109, n°45, p. 18431-18436.
- Ziros P.G., Kokkinos P.A., Legaki E., Vantarakis A. 2011. Development of an optimized method for the detection of airborne viruses with real-time PCR analysis. *Virology Journal* 8, 369-37

Chapitre III) Aérosolisation des virus à partir du sol

Ce chapitre doit donner lieu à la publication suivante en cours de rédaction :

Girardin G. et al., 2015. Virus aerosolization from soil during windy periods following irrigation by contaminated water. *Journal of Applied Microbiology*, Soumission prévue avant la fin mai 2015.

III.1.	INTRODUCTION :	45
III.2.	MATERIELS ET METHODES.....	46
III.2.a.	Matériels	46
III.2.b.	Protocoles expérimentaux et plan d'expérience.....	48
III.2.c.	Modélisation des processus, analyse d'incertitude et traitement des données	53
III.3.	RESULTATS ET DISCUSSIONS	59
III.3.a.	Incertitudes et biais liés aux métrologies et protocoles expérimentaux.....	59
III.3.b.	Résultats des expérimentations sous tunnels.....	68
III.4.	CONCLUSION	83

Résumé :

Réutiliser les eaux usées en irrigation agricole aide à répondre aux besoins croissants d'eau, réduit leur décharge dans des eaux conventionnelles et participe à la fertilisation des sols. Les eaux usées d'origine domestique contiennent des virus entériques de l'homme responsables d'épidémies transmises par voies hydrique et alimentaire. Leur transmission aérienne avec maladie à la clé existe, mais rien n'est connu sur le devenir de virus déposés à la surface du sol ou de végétaux. Ce travail visait à évaluer et décrire l'aérosolisation de virus apportés par irrigation sur sol nu. Des suivis expérimentaux ont été réalisés en placettes semi-contrôlées contaminées par des mengovirus murins à l'aide de la méthode des tunnels ventilés. Les virus en suspension dans l'air étaient piégés en sortie de tunnel par des bio-collecteurs (Impingers et filtres) dont nous avons évalué les performances, et leur ARN a été quantifié en RT-qPCR. Un modèle a été proposé pour un ou plusieurs pools de virus aérosolisables, chacun étant caractérisé par sa taille et un coefficient cinétique d'aérosolisation. Nous l'avons utilisé pour générer des expériences numériques reproduisant la variabilité des mesures réelles, et pour ajuster à ces expériences numériques des simulations portant soit sur l'aérosolisation cumulée soit sur l'aérosolisation instantanée. Les ajustements sur l'aérosolisation instantanée donnent des estimations plus précises du coefficient cinétique d'aérosolisation ; il n'en va pas forcément de même pour la quantité de virus aérosolisables. Toutefois, l'existence de plusieurs pools de virus peut rendre l'estimation de ce dernier coefficient plus aléatoire. Les Impingers aboutissaient à des estimations d'aérosolisation plus élevées que les filtres, en conséquence probablement d'un piégeage initial moins bon et/ou d'une extraction directe des ARN viraux sur les filtres incomplète. Pour un débit d'air les traversant de $4 \text{ L} \cdot \text{min}^{-1}$, les Impingers piègent environ 77 % des virus dans l'air les traversant avec un coefficient d'aérosolisation des virus de 0.11. Les expériences sous tunnels ventilés montrent qu'entre 0.8 et 23 % des virus apportés ont été remobilisés. On distingue un pool de virus aérosolisés quasi-instantanément, d'un ou plusieurs pools cinétiques de virus aérosolisés plus progressivement. Ce premier pool correspondrait approximativement aux virus aérosolisés durant les 30 premières minutes, soit à environ 1/3 de la quantité totale de virus aérosolisés. Pour les virus mobilisés progressivement, le coefficient cinétique d'aérosolisation varie entre 0.007 et 0.21, correspondant à 90 % des virus du pool aérosolisés au bout de respectivement 13 j et 11 h. L'ajustement simultané des simulations aux données de toutes les expériences sous tunnel permet de reproduire les expériences *in situ* et de mieux identifier quelques données aberrantes. En utilisant cet ajustement, les émissions sont comprises entre 1 % et 10 % de la quantité initiale apportée.

Mots clés : Réutilisation des eaux usées, Irrigation, Sol, Virus, Aérosolisation, Impinger

III.1. Introduction :

À l'échelle planétaire, on assiste à des problèmes croissants de ressources en eau, en quantité et en qualité (Van der Bruggen, 2010). Ces problèmes résultent de l'accroissement de la population mondiale et de l'urbanisation (Qadir et al., 2010 ; Kennedy et al., 2012), du changement climatique planétaire (Bates et al., 2008 ; Bixio et al., 2006), de la diversification des usages de l'eau (Asano, 1998), de la surexploitation d'aquifères (Taylor et al., 2012 ; Giungato et al., 2010), et du déversement d'eaux usées insuffisamment traitées dans les eaux conventionnelles (Van der Bruggen, 2010). Déjà pratiquée dans certains pays (Van der Bruggen, 2010 ; Raschid-Sally and Jayakody, 2008 ; Ensink et Van der Hoek, 2006), la réutilisation d'eaux usées en irrigation permet d'exploiter cette ressource marginale, limite son rejet dans l'environnement, et peut contribuer à fertiliser les cultures (en N, P ...) en fonction des traitements effectués sur ces eaux (Jiménez et al., 2010 ; Bixio et al., 2008 ; Keraita et al., 2008 ; Ensink et Van der Hoek, 2006). Elles présentent toutefois des risques pour les productions agricoles, l'environnement et la santé (Pachepsky et al., 2011). Eu égard à la santé, les risques résultent de la présence de produits chimiques et d'agents pathogènes de l'homme, dont certains virus entériques peu éliminés par les traitements secondaires de type 'boues activées' (Da Silva et al., 2011 ; La Rosa et al., 2010 ; Petrinca et al., 2009 ; Carducci et al., 2009 ; Van den Berg et al., 2005 ; Pusch et al., 2005). Ils sont de plus en plus souvent incriminés dans les épidémies d'origines hydrique (Craun et al., 2010 ; Reynolds, 2008 ; WHO, 2006 ; Koopmans et Duizer, 2004) et alimentaire (Cook et D'Agostino, 2013). Les principaux virus incriminés sont les norovirus, les enterovirus (poliovirus, coxsackievirus, echovirus), les rotavirus, les adenovirus, et le virus de l'hépatite A (Rodríguez-Lázaro et al., 2012). La commission du Codex Alimentarius a reconnu en 2012 que les virus entériques de l'homme les plus fréquemment mentionnés comme responsables d'épidémies d'origine alimentaire sont les norovirus et le virus de l'hépatite A (CAC/GL 79-2012).

Apportés par les eaux usées lors d'irrigations, les virus entériques peuvent se déposer sur les parties aériennes des plantes ou à la surface du sol, être transportés dans le sol vers les racines des plantes et l'aquifère, atteindre des cours d'eau à proximité, ou être dispersés dans l'atmosphère. De nombreux travaux ont traité du devenir des virus dans le sol (Cao et al., 2010 ; Syngouna et Chrysikopoulos, 2010 ; Zhuang et Jin., 2008, parmi bien d'autres références), et quelques ont traité des possibilités d'internalisation de virus dans les plantes à partir des racines (DiCaprio et al., 2015 ; Hirneisen et Kniel, 2013 ; DiCaprio et al., 2012 ; Wei et al., 2011 et 2010 ; Urbanucci et al., 2009 ; Chancellor et al., 2006). Quelques études ont traité du transfert de bactéries au cours d'aspersion (Goldstein et al., 2014 ; Blatny et al., 2008). En contraste et à notre connaissance, aucune étude n'a porté sur la ré-aérosolisation de virus déposés à la surface des feuilles ou des tiges de plantes, ou du sol, bien que des modèles d'évaluation quantitative des risques microbiens (QMRA) ont déjà été proposés pour la contamination par voie aérienne d'agriculteurs réutilisant des eaux usées (Mara et al., 2007). En environnement intérieur, des contaminations *via* l'air par des virus entériques de l'homme avec présence de symptômes ont été clairement démontrées au restaurant (Marks et al., 2000), à école (Marks et al., 2003) et en hôpital (Nenonen et al., 2014). Le transfert peut combiner l'inhalation de virus, leur dépôt dans les voies respiratoires supérieures, et *in fine* leur déglutition avec le mucus des voies respiratoires (Nazaroff, 2011). Certaines études ou synthèses bibliographiques traitent de la remise en suspension des bioaérosols, parfois appelés libération passive, en environnement extérieur sans faire référence à des virus (par exemples Morris et al. (2014), Layshock et al. (2012), Jones et Harrison (2004), et Aylor (1990) parmi d'autres). *In situ*, la présence de virus entériques de l'homme dans l'air a été notée au voisinage des stations de traitement des eaux usées, en particulier pendant les épisodes venteux

(Masclaux et al., 2014 ; Ziros et al., 2011 ; Fracchia et al., 2006 ; Carducci et al., 1995), et lors d'épandages de biosolides (Brooks et al., 2005).

Les objectifs de ce travail étaient d'évaluer la possibilité pour les virus initialement déposées au sol par l'irrigation d'être aérosolisés pendant des périodes venteuses, en se concentrant sur la quantité totale de virus aérosolisés - exprimée en fraction de la quantité totale de virus apportés - et la vitesse à laquelle ce phénomène se produit. La quantité totale de virus pouvant être aérosolisés et la cinétique d'aérosolisation ont été analysées en fonction du contexte : rayonnement solaire, vent, humidité du sol, température de surface, et composition chimique de l'eau d'irrigation. Pour atteindre ces objectifs, nous avons adapté la technique des tunnels ventilés déjà utilisée pour étudier la volatilisation de NH_3 et de pesticides (Bedos et al, 2002 ; Lockyer, 1984 ; Loubet et al, 1999a et 1999b), évalué le rendement de filtres en polycarbonate et d'Impingers AGI-4 (West et Kimber., 2015 ; Verreault et al., 2008 ; Burton et al., 2007 ; Lin et al., 1997) utilisés pour piéger des virus aérosolisés et proposé une correction des données, et évalué l'incertitude et les biais possibles dans les estimations de paramètres liés à la quantité totale de virus pouvant être aérosolisés et à la cinétique d'aérosolisation. Pour ce faire nous nous avons utilisé le mengovirus murin, déjà utilisé comme modèle de picornavirus (virus hépatite A...) (Sano et al., 2015 ; Costafreda et al., 2006 ; Pinto et al., 2009) apporté par irrigation à un Cambisol (FAO classification).

III.2. Matériels et méthodes

III.2.a. Matériels

III.2.a.i. *Le virus :*

Nous avons utilisé la souche MC0 cytopathogène du mengovirus murin (MVM), initialement obtenue par Martin et al. (1996), qui nous a été aimablement fournie par le Pr. A. Bosch (Université de Barcelone, Espagne) avec les cellules BGM (Buffalo Green Monkey Kidney) obtenues par Barron et al. (1970) et utilisées pour la production du virus.

Les mengovirus ont été produits en milieu Dulbecco's modified Eagle (Gibco ®, réf. : 31966047, USA) complété avec 10 % (v/v) de sérum de veau foetal, (Gibco ®, réf. : 10270098, USA), 5 % (v/v) d'acide aminé non essentiel (Fisher, réf. : 11350912), 1 % d'Antibiotique-Antifongique (Gibco ®, Pénicilline Streptomycine (réf. : 15290-018) et Fungizone (réf. : 15290-018) sous une atmosphère à 9 % de CO_2 à 37°C. Un inoculum viral d'environ 10^5 gc est mis en contact pendant 60 min avec des cellules BGM à 90% de confluence en flacons de 175 cm^2 (Greiner bio-one, réf. : 660175) ; le milieu de culture est renouvelé ensuite. Après 3 jours d'incubation, le milieu de culture est récupéré avec les cellules (sans action physique ou chimique pour décoller les cellules) et passé aux ultrasons pendant 10 cycles de 15 secondes chacun. La suspension ainsi obtenue est ensuite centrifugée pendant 5 min à 2700 g afin de faire sédimenter les débris cellulaires. Le surnageant est récupéré et aliquoté en doses d'environ 35-40 mL stocké en tubes stériles de 50 mL (Falcon®) et conservé à -21°C.

Pour chacune des expériences sous tunnel ventilé, 3 doses de 35-40 mL à environ 10^8 gc.mL⁻¹ ont été mises à la température ambiante environ 1 h avant le lancement de l'expérimentation ; 100 mL sont ensuite dilués avec de l'eau pure (type MilliQ) ou de l'eau usée autoclavée pour aboutir à 1 L de suspension virale (10^{10} gc.L⁻¹). Cette suspension a été apportée de manière aussi homogène que possible

à l'aide d'un pulvérisateur. Pour les expériences de qualification des Impingers, l'un des deux types de biocollecteurs utilisés, la suspension virale initiale était diluée au 20^{ème} dans du PBS au 10^{ème}.

La quantification du génome du mengovirus murin a été réalisée par RT-qPCR sans étape de pré-concentration. En pratique, pour chaque solution de piégeage des Impingers, nous avons extrait entre 55 et 60 μL d'ARN viral à partir des 140 μL d'échantillon au moyen d'un kit d'extraction (kit QIAamp® Viral RNA (Qiagen®, ref : 52906)). Pour les filtres, une extraction directe par tampon de lyse a été réalisée au moyen du kit d'extraction. La RT-qPCR a été réalisée au moyen du kit RNA UltraSense® One-step Quantitative RT-PCR System (Life Technologies ® ref 11732-927) avec les amorces : anti-sens 5' - GAAGTAACATATAGACAGACGCACAC - 3', sens GCGGGTCCTGCCGAAAGT et sonde TaqMan ATCACATTACTGGCCGAAGC décrite par [Pinto et al. \(2009\)](#) selon les recommandations du fabricant. La concentration finale de l'amorce « reverse » est de 1124 nM, 625 nM pour les amorces « Forward » et 312 nM pour les sondes. Toutes les amplifications ont été réalisées avec l'appareil Mx3005P PCR quantitative (qPCR) (Agilent Technologies, France).

III.2.a.ii. *Le sol*

Les mesures ont été effectuées sur un cambisol calcaire (classification FAO) du domaine Saint-Paul de l'INRA (43°92' N, 4°88' E) à proximité d'Avignon. Les propriétés du sol prélevé entre 0 et 10 cm de profondeur, et mesurées au Laboratoire d'Analyse des Sols (LAS-INRA) à Arras (France), étaient les suivantes : CaCO_3 362 g.kg^{-1} ; et après décarbonatation, argile 238 g.kg^{-1} ; limon 227 g.kg^{-1} ; sable 169 g.kg^{-1} ; carbone organique 14.3 g.kg^{-1} ; N total 1.35 g.kg^{-1} ; N-NH_4^+ 1.45 mg.kg^{-1} ; N-NO_3 6.89 mg.kg^{-1} . Le pH(eau) du sol et le pH(KCl 1 M) étaient respectivement de 8.38 et 7.75. Les concentrations en Ca^{2+} , Mg^{2+} , K^+ , et Na^+ extraits à l'eau étaient respectivement de 0.114, 0.0089, 0.0653 et 0.0105 g.kg^{-1} ; la concentration en Cl^- et en S total extraits à l'eau étaient respectivement de 0.0079 et 0.00487 g.kg^{-1} . La conductivité électrique de la solution pour un rapport massique solution/sol de 5 était de 0.144 mS.cm^{-1} . Le sol a été maintenu en herbe de 2011 à mars 2014 ; le 12 mars de cette dernière année, il a été retourné sur une profondeur d'environ 15 cm ; le sol a alors été travaillé sur une profondeur d'environ 10 cm successivement par un rotavator le 25 mars, puis à nouveau par un rotavator et une herse rotative le lendemain.

La structure du sol obtenue est illustrée par la Figure III.1. La terre en surface était principalement constituée de mottes de 5 à 40 mm de diamètre. Pour chaque expérience *in-situ*, le sol contaminé par l'expérience précédente était excavé sur environ 10 cm et remplacé par du sol de la même parcelle prélevé à quelque mètres sur la même profondeur. La structure du sol en surface ne présentait pas de différence apparente entre expériences.



Figure III.1 : Structure du sol des placettes expérimentales.

Les précipitations annuelles moyennes sont de 687 mm pour la période 1989-2014. En 2014, elles ont été plus élevées (969 mm). Entre le début (20 mai) et la fin (10 juillet) des expériences, les précipitations ont été de 138 mm.

III.2.a.iii. Les eaux :

Deux types d'eaux d'irrigation contaminées ont été utilisés pour l'irrigation précédant les suivis d'aérosolisation des virus :

- de l'eau de type MilliQ ou de l'eau Ultrapure obtenue par filtration et passage sur résine échangeuse d'ions et sous UV ;
- de l'eau usée prélevée à la sortie de 8 lagunes utilisées comme complément avant réutilisation au traitement secondaire des eaux usées par boue activée à Clermont-Ferrand. Afin d'éliminer tous les microorganismes (forme végétative et spores) l'eau a été autoclavée 3 fois avec approximativement 12 à 20 h à température ambiante entre chaque autoclavage. L'eau usée contenait 10 mg.L⁻¹ de matière organique en suspension et 24.1 mg.L⁻¹ de carbone organique. Les matières minérales incluent Ca²⁺ (93.6 mg.L⁻¹), Mg²⁺ (17.5 mg.L⁻¹), K⁺ (34.4 mg.L⁻¹), Na⁺ (87.5 mg.L⁻¹), NH₄⁺ (4.89 mg N.L⁻¹), NO₃⁻ (0.6 mg N.L⁻¹), Cl⁻ (129 mg.L⁻¹) et S total (21.5 mg.L⁻¹), et son pH était de 8.34. La suspension virale épanchée est préparée en mélangeant 100 mL de la suspension virale mère avec 900 mL d'eau ultrapure ou d'eau usée autoclavée. Un litre de cette suspension virale est pulvérisée sur les placettes à environ 15 cm du sol de façon à couvrir toute la surface soit 10¹⁰ virus déposés.

III.2.b. Protocoles expérimentaux et plan d'expérience

III.2.b.i. *Protocole expérimental :*

Pour chaque expérience sous tunnel, une placette de sol de 0.5 × 2 m (1 m²) préalablement travaillée, voire irriguée, était arrosée uniformément à l'aide d'un pulvérisateur par 1 L d'eau contenant environ 10¹⁰ gc.L⁻¹ de mengovirus murin à une date initiale (t=0). La placette était alors recouverte d'un plexiglass de forme plus ou moins hémicylindrique, délimitant un tunnel d'environ 0.24 m² de section. A une extrémité du tunnel ainsi formé, une cheminée permettait de prélever l'air balayant le tunnel à environ 2 m au-dessus du sol ; à l'autre extrémité, un ventilateur tendait à expulser l'air du tunnel et permettait d'imposer dans le tunnel un vent de vitesse choisie entre 11 et 30 km.h⁻¹ (Figure III.2a-b). Chaque expérience donnait lieu à un suivi *in situ* pendant 2 à 3 jours ; les dates typiques de changement des impingers et des filtres après le début de chaque expérience étaient de 0.5, 4, 8.3, 22, 27, 33, 48, 56 h.

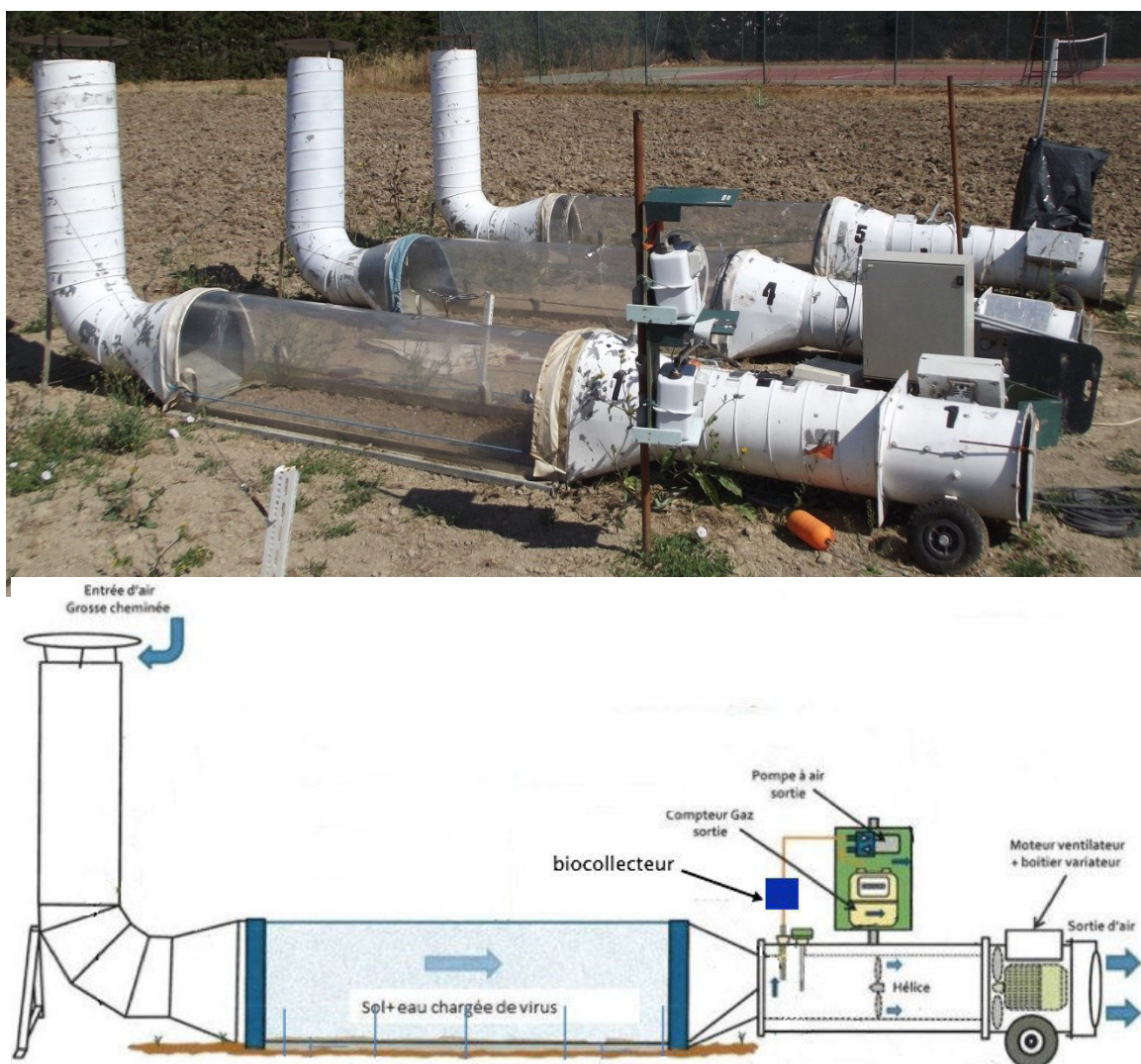


Figure III.2 : Tunnels ventilés : (a) Photographie, et (b) schéma du tunnel.

Deux biocollecteurs ont été utilisés :

- des Impinger AGI-4 (Ace Glass incorporated, USA, réf : 7541) ayant été utilisés dans des travaux pour la détection de virus respiratoires ([Hermann et al., 2006](#)), et de bactériophages ([Liu et al., 2012](#) ; [Harstad, 1965](#)). L'air était aspiré en sortie de tunnel avant le ventilateur au niveau des perforations d'un système perforé tri-branche par une pompe HX16908 ou GR42X25 (ACP, Mennecey, France) avec un débit entre 2.9 et 4.6 L.min⁻¹. L'air prélevé traversait 20 mL d'une solution de piégeage contenue dans des Impingers ;

- des filtres polycarbonate de 0,8 µm (Whatman® Nucleopore réf. : 111109) déjà utilisés pour le piégeage d'un bactériophage ([Burton et al., 1993](#)) avec un débit d'environ 5 L.min⁻¹.

La solution de piégeage utilisée dans les Impingers a été du PBS au 10^{ème} pour les deux premières expériences (1 et 2), puis un milieu de culture (9.4 g MEM (Sigma, réf. : A0769) ; 14 ml HEPS 1 M (Sigma, réf. : A3268) ; 20 ml Bicarbonate (Gibco ®, réf. : 25080-060) ; 5 ml –Antifongique (Gibco ®, Fungizone réf. : 15290-018) ; 10 ml Antibiotique (Gibco ®, Pen Strep réf. : 15290-018) ; 100 µl Antifoam B (Sigma, réf. : A3268) ; Qsp 1 L d'eau MilliQ).

A différentes dates, les Impingers et les filtres (et porte-filtres) en place étaient remplacés par de nouveaux Impingers pré-remplis avec leur solution de piégeage et par de nouveaux filtres. La quantité récupérée de solution de piégeage des Impingers était mesurée, et conservée à -21°C pour analyses en RT-qPCR. Les Impingers servant au piégeage des virus sur les temps les plus longs (au-delà de 4 h) recevaient 40 mL de solution de piégeage au lieu de 20 mL. La quantité de virus aérosolisée pendant le temps de piégeage dans un Impinger était estimée à l'aide de l'équation suivante :

$$N_{v-a}(\Delta t) = \left(\frac{C_v \times w_{imp}}{d_{pomp} \times \Delta t} \right) \times v_{wind} \times S_{tun} \times \Delta t \times 1000 \quad (III.1)$$

où Δt est la durée de piégeage dans l'impinger (h), $N_{v-a}(\Delta t)$ la quantité de virus aérosolisés (gc) sous le tunnel pendant l'intervalle de temps Δt , C_v la concentration en virus dans la solution de piégeage de l'Impinger, w_{imp} le volume de la solution de piégeage (L), d_{pomp} est le débit de la pompe en série avec l'Impinger ($L.h^{-1}$), v_{wind} est la vitesse du vent ($m.h^{-1}$), et S_{tun} est la section du tunnel (m^2).

Plusieurs variables ont été suivies parallèlement : humidité des 3 premiers cm environ de la couche de surface du sol, température de surface du sol, humidité relative et température de l'air dans le tunnel, vitesse du vent dans le tunnel.

Cinq sondes d'humidité EC-10 (Decagon Devices Inc., Pullman (WA), USA) ont été placées horizontalement sur la tranche affleurant à la surface du sol, l'axe de la sonde étant à environ 1.5 cm sous la surface du sol ; elles nous ont permis d'accéder à la permittivité diélectrique du sol, elle-même reliée à l'humidité volumique du sol proche de la surface. Les sondes EC-10 ont été préalablement calibrées dans de l'eau, dans du méthanol et sur sol sec ou humide (sol prélevé sur la parcelle expérimentale, tamisé à 2 mm). La température de surface du sol a été mesurée pour chaque tunnel à l'aide de 5 thermocouples de type T (jonction cuivre-constantan) immobilisés en surface du sol, une sonde de platine de type PT100 nous donnant la température au niveau des jonctions de référence.

La température de l'air a été mesurée, pour chaque tunnel, par 2 autres thermocouples de même type scotchés au plexiglass des tunnels avec la jonction sensible cuivre/constantan à environ 50 cm du sol.

Enfin, chaque tunnel a été équipé d'une sonde d'humidité relative de l'air HMP155 (HUMICAP®, Vaisala Oyj, Helsinki, Finlande) en sortie de tunnel. La vitesse du vent a été mesurée par un anémomètre à mesure d'impulsions.

Les données ont été collectées toutes les 10 s et moyennées toutes les 10 min par 2 centrales d'acquisition de données CR10 et CR10X (Campbell Scientific Ltd., Loughborough, Royaume-Uni). Un multiplexeur AM1632 (Campbell Scientific Ltd.) était relié à la CR10X. Les thermocouples étaient connectés à un câblage classique (1 seul métal conducteur) dans un petit boîtier isolé thermiquement et contenant la sonde PT100 de référence ; ce câblage et la sonde PT100 étaient reliés au multiplexeur AM1632 ; les sondes d'humidité volumique EC-10 et la sonde d'humidité relative de l'air HMP155 étaient connectées à ce même multiplexeur. L'anémomètre par mesure d'impulsions était relié directement à la même centrale ou à une CR10 dans le cas de 2 expériences menées en parallèle.

Une station météorologique située sur une parcelle voisine de la parcelle expérimentale nous a permis d'avoir accès au rayonnement global incident, à la température de l'air sous abri à 2 m du sol, à la vitesse du vent et à sa direction, et aux précipitations avec des données toutes les 30 min.

III.2.b.ii. Plan d'expérience :

Sept expériences sous tunnel ventilé ont été suivies. Elles se différenciaient par la vitesse imposée du vent (de 11 à 28 km.h⁻¹), par l'humidité initiale de la couche de surface du sol (de 1.2 à 18.7 % d'humidité volumique au lancement des expériences pour environ les 3 premiers cm du sol) avec notamment apport de 9.5 L d'eau du robinet correspondant à une hauteur de 9.5 mm avant l'irrigation contaminante pour l'expérience n°3, par la nature de l'eau contaminée par les virus (eau pure en dilution de la solution de conservation des virus, ou eau usée autoclavée pour les expériences n°6 et n°7 (Tableau III.1).

Tableau III.1 : Caractéristiques des 7 expériences menées sous tunnel ventilé.

Toutes les expériences ont duré 55 h à l'exception de l'expérience n° suivie sur 24 h.

Expérience	Conditions imposées			Commentaires ***
	Vitesse du vent (km.h ⁻¹)	Irrigation avant contamination (mm eau)	Eau contaminée	
1 (20-22/05/2014)	28	-	Eau pure*	T _{air} = 22.2°C θ _{0-3 cm} (t=0)=2.8%
2 (20-22/05/2014)	11	-	Eau pure*	T _{air} = 22.8°C θ _{0-3 cm} (t=0)=1.7%
3 (2-04/062014)	22	+9.5 mm	Eau pure*	T _{air} = 22.8°C θ _{0-3 cm} (t=0)=18.5%
4 (2-04/062014)	26	-	Eau pure*	T _{air} = 21.8°C θ _{0-3 cm} (t=0)=1.5%
5 (10-11/06/2014)	25**	-	Eau pure*	T _{air} = 26.8°C θ _{0-3 cm} (t=0)=3.7%
6 (8-10/07/2014)	26	-	Eau usée*	T _{air} = 20.3°C θ _{0-3 cm} (t=0)=3.9%
7 (8-10/07/2014)	11**	-	Eau usée*	T _{air} = 20.9°C θ _{0-3 cm} (t=0)=2.7%

* : Utilisation d'eau ultra-pure (type MilliQ®) ou d'eau déminéralisée (résine échangeuse d'ion, osmose inverse et UV) pour la préparation de la suspension virale ; ** : Vitesse du vent théorique ; *** : Température de l'air dans les tunnels à 50 cm du sol (T_{air}) et humidité des 3 premiers centimètres (θ_{0-3 cm}) moyennée sur l'ensemble de la durée de chaque expérience.

D'autres paramètres ont varié avec les expériences et au cours des expériences, notamment le rayonnement global et la température de surface du sol qui peut directement affecter l'importance des forces de type hydrophile/hydrophobe.

III.2.b.iii. Tests préliminaires sur les Impingers

Nous avons utilisé parallèlement 2 types de biocollecteurs dans ce travail : (i) des Impingers AGI-4 (Ace Glass incorporated, USA, réf. : 7541) contenant une solution de piégeage (solution de PBS au 10^{ème} ou milieu de récupération spécifique) traversée par l'air contenant les virus à raison d'un débit compris entre 3.5 et 4.5 L.min⁻¹ pour les tests de laboratoire et entre 2.9 et 4.6 L.min⁻¹ pour les expériences *in situ* sous tunnel, et (ii) des filtres de 47 mm de diamètre en polycarbonate de porosité

0,8 µm (Whatman® Nucleopore réf. : 111109) tenues par des portes-filtres de 47 mm en polypropylène Swinnex® (HERCK MILLIPORE, réf : SX0004700). L'utilisation de ces biocollecteurs présentait *a priori* des limites susceptibles de biaiser les mesures :

- pour les Impingers, une efficacité de piégeage imparfaite (Dart et Thornburg, 2008), et la possibilité d'une ré-aérosolisation des particules piégées (Lin et al., 1997), en particulier pour les particules hydrophobes (Grinshpun et al., 1997) ;
- pour les filtres, un piégeage imparfait (Verreault et al., 2008 ; Henningson et Ahlberg, 1994) et une élution ultérieure incomplète des virus ou de leur ARN.

L'estimation de la concentration en virus dans l'air était presque toujours plus élevée lorsqu'elle était estimée à partir des Impingers. Nous avons voulu qualifier leurs performances.

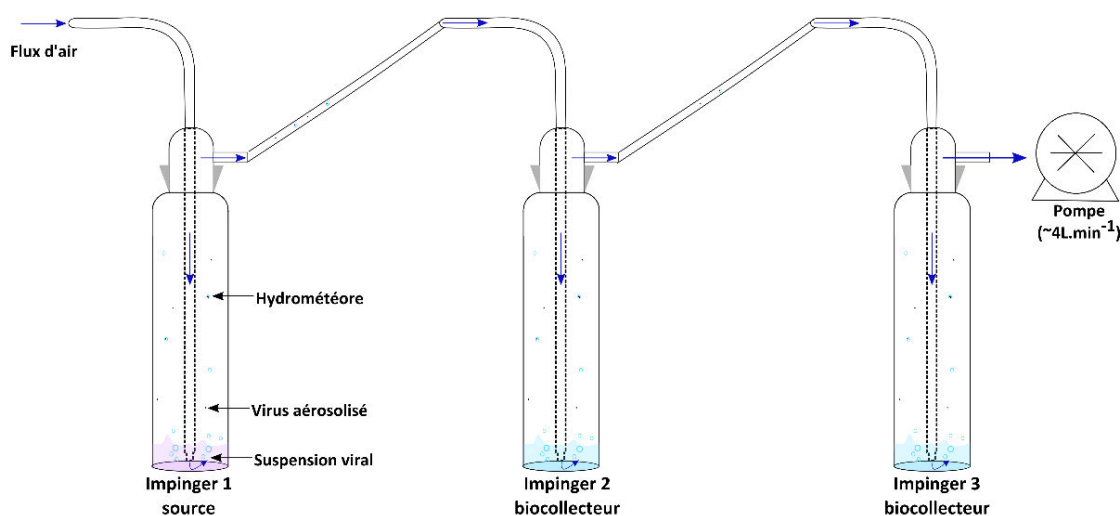


Figure III.3 : Dispositif en série de 3 Impingers pour évaluer la ré-aérosolisation des virus contenus dans la solution de piégeage du 1^{er} Impinger et la fraction des virus entraînés par l'air qui sont piégés dans les Impingers 2 et 3.

Concrètement, nous avons réalisé quelques suivis complémentaires au laboratoire avec 3 Impingers en série. Les 3 Impingers recevaient chacun pour 2 tests 10 mL, pour 3 des tests 20 mL d'une solution de PBS, et pour les 2 derniers 40 mL (Figure III.3). Dans le premier des 3 Impingers, on substituait 0.5, 1 ou 2 mL de solution par le même volume de suspension virale (de concentration de l'ordre de $1.5 \cdot 10^8 \text{ gc.mL}^{-1}$) lorsque l'Impinger avait reçu respectivement 10, 20 et 40 mL de solution. En aval du 3^{ème} Impinger, une pompe HX16908 ou GR42X25 aspirait l'air avec un débit de l'ordre de 4 L.min^{-1} . A quelques dates jusqu'à 6 h, environ 0.2 mL de solution était prélevé dans chaque Impinger pour analyse ultérieure. A chaque date de prélèvement, un ajout de solution de PBS était réalisé si nécessaire pour compenser approximativement les pertes de volume.

Pour chacun de ces suivis, l'analyse a porté sur l'évolution de la quantité de virus contenus dans l'Impinger 1, comme moyen d'évaluer l'importance de la ré-aérosolisation, et sur le rapport des concentrations en virus dans les Impingers 3 et 2 comme un moyen indirect d'évaluer l'efficacité du piégeage.

III.2.c. Modélisation des processus, analyse d'incertitude et traitement des données

III.2.c.i. Qualification des Impingers

Les virus en suspension dans l'air traversant les Impingers sont susceptibles de n'être que partiellement piégés par la solution des Impingers, le taux de piégeage dépendant de la quantité de liquide dans l'Impinger (20 ou 40 mL suivant l'intervalle de temps entre deux mesures), de l'importance du débit d'air traversant le liquide (environ 4 L.min⁻¹) (Grinshpun et al., 1997 ; Li et al., 1999), et éventuellement de la composition du liquide (Yu et al., 2009 ; Tseng et Li, 2005). L'agitation de la solution de piégeage et l'éclatement des bulles d'air à la surface de la solution de piégeage peuvent amener à une ré-aérosolisation des virus (Lin et al., 1997 ; Grinshpun et al., 1997) par formation d'hydrométéores contenant des virus entraînés avec l'air en sortie d'Impinger et/ou en étant remis en suspension dans l'atmosphère pour les colloïdes hydrophobes préalablement retenus au niveau des interfaces 'eau-air'.

Nous avons défini le coefficient de piégeage k_p comme le rapport entre la quantité de virus piégés dans la solution d'un Impinger et la quantité de virus initialement contenus dans l'air ayant traversé l'Impinger ; k_p est compris entre 0 et 1, ces valeurs extrêmes correspondant respectivement à l'absence de piégeage de virus et au piégeage de tous les virus initialement contenus dans l'air. k_p varie *a priori* avec les conditions de piégeage : volume (et hauteur) de la solution de piégeage dans l'impinger, débit d'air traversant la solution, taille et trajectoire des bulles d'air traversant la solution de piégeage, composition chimique de la solution de piégeage, modèle d'Impinger. De la même façon, nous avons défini un coefficient de ré-aérosolisation k_h comme le coefficient de proportionnalité entre la quantité de virus ré-aérosolisée par unité de temps et la concentration en virus piégée dans la solution de piégeage de l'Impinger. k_h varie *a priori* avec les conditions de piégeage. Tant que les conditions dans l'Impinger ne varient pas trop, la variation de concentration en virus C_v dans l'Impinger (gc.L⁻¹) vérifie l'équation suivante :

$$\frac{\partial C_v}{\partial t} = k_p \times \left(\frac{A}{w_{\text{imp}}} \right) - k_h \times C_v \quad (\text{III.2})$$

avec A la quantité de virus entrant dans un Impinger par unité de temps (gc.h⁻¹). En supposant A , k_p et k_h constants en première approximation sur la durée de fonctionnement (piégeage) d'un Impinger, on obtient alors l'évolution de C_v dans le temps :

$$C_v = \left(\frac{k_p}{k_h} \times \left(\frac{A}{w_{\text{imp}}} \right) \right) \times (1 - e^{-k_h \times t}) \quad (\text{III.3})$$

L'équation (III.4) se substitue à l'équation (III.3) pour un piégeage idéal (i.e. 100% de piégeage, et aucune ré-aérosolisation)

$$C_v = \left(\frac{A}{w_{\text{imp}}} \right) \times t \quad (\text{III.4})$$

Dans les conditions énoncées précédemment, les concentrations expérimentales peuvent alors être multipliées par un facteur de correction f_c dépendant de la durée t de l'accumulation dans l'Impinger, de coefficient de piégeage k_p et du coefficient de ré-aérosolisation k_h :

$$f_c = \frac{1}{k_p} \times \frac{k_h \times t}{1 - e^{-k_h \times t}} \quad (\text{III.5})$$

f_c admet pour limites quand t tend vers 0 ou $+\infty$:

$$\lim_{t \rightarrow 0} (f_c) = \frac{1}{k_p} \quad (\text{III.6a})$$

$$\lim_{t \rightarrow \infty} (f_c) = +\infty \quad (\text{III.6b})$$

Un exemple de simulation est proposé dans la Figure III.4.

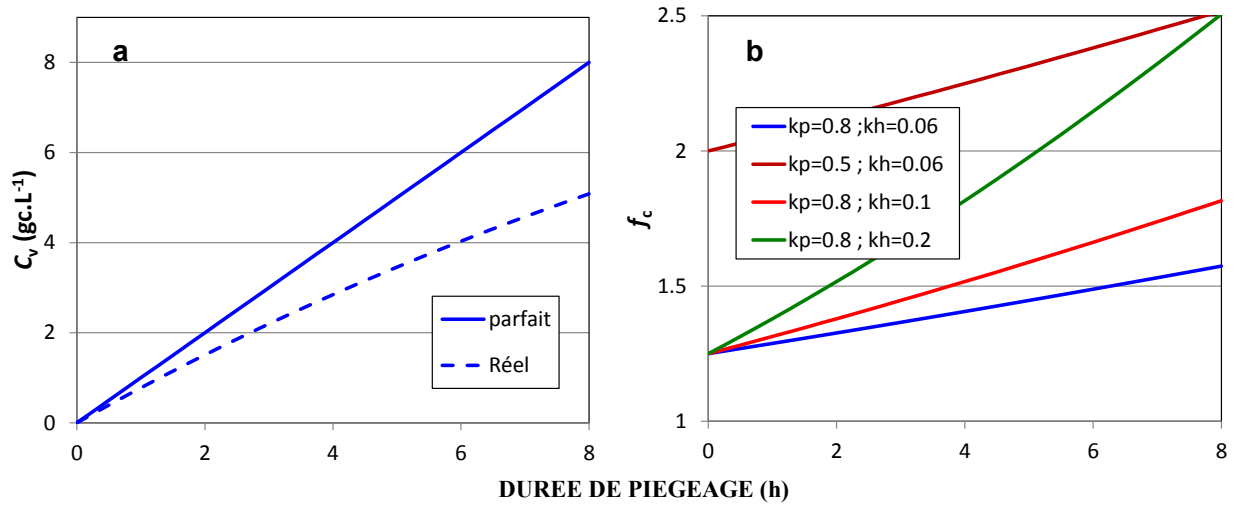


Figure III.4 : (a) Evolution des concentrations en virus dans la solution de piégeage d'un Impinger pour un piégeage total sans ré-aérosolisation ou imparfait avec ré-aérosolisation ($k_p=0.8$ et $k_h=0.05$) ; (b) facteur de correction multiplicatif à appliquer aux concentrations mesurées en virus en fonction de k_p , de k_h et de la durée de fonctionnement de l'Impinger.

Les changements les plus susceptibles de se produire *in situ* sont une variation du niveau de la solution dans l'Impinger (et indirectement de sa composition), ainsi qu'un changement de température, même si les Impingers sont en partie protégés du rayonnement par de l'aluminium.

III.2.c.ii. Analyse d'incertitude sur l'aérosolisation dans la méthode des tunnels ventilés

La méthodologie retenue dans ce travail était potentiellement limitée par les limites inhérentes à la RT-qPCR. Il était nécessaire de faire une évaluation *a priori* des incertitudes pour savoir jusqu'où des écarts entre contextes doivent être discutés et de comparer différents modes d'estimation des mêmes grandeurs. En pratique, il s'agissait pour nous d'appréhender au mieux, pendant les 2-3 premiers jours consécutifs à un apport, l'incertitude sur l'estimation de la quantité maximale de virus aérosolisés (ou quantité mobilisable de virus) et l'incertitude sur l'estimation du coefficient cinétique d'aérosolisation.

Cette dernière grandeur, définie dans la suite de ce document, caractérise la vitesse à laquelle les virus sont remis en suspension dans l'atmosphère. Bien évidemment, la quantité de virus mobilisables et le coefficient cinétique d'aérosolisation dépendent de chaque contexte.

Un travail préliminaire nous a amenés à considérer 2 méthodes d'estimation de ces 2 grandeurs (quantité mobilisable de virus et coefficient cinétique d'aérosolisation) : l'une en travaillant sur la quantité cumulée de virus aérosolisés au cours du temps, l'autre en travaillant sur l'évolution de l'aérosolisation « instantanée » au cours du temps. Il nous fallait voir si l'une ou l'autre de ces méthodes s'avérait plus performante pour estimer les grandeurs recherchées.

Après apport d'une quantité totale de virus N_{v-t} (gc) au sol, on suppose qu'une quantité totale de virus $N_{v-m}(t=0)$ (gc) est mobilisable par le vent, et que le taux d'aérosolisation $\partial N_{v-a}/\partial t$ (gc.h⁻¹) (gc.h⁻¹) est proportionnel à la quantité de virus encore mobilisable à la surface du sol N_{v-a} (gc) à la date t (h) :

$$\frac{\partial N_{v-a}(t)}{\partial t} = -\frac{\partial N_{v-m}(t)}{\partial t} = +k_a \times N_{v-m}(t) \quad (\text{III.7})$$

où k_a est un coefficient cinétique d'aérosolisation (h⁻¹). L'intégration de cette équation aboutit à l'équation suivante :

$$N_{v-a}(t) = N_{v-m}(t=0) \times (1 - \exp(-k_a \times t)) \quad (\text{III.8})$$

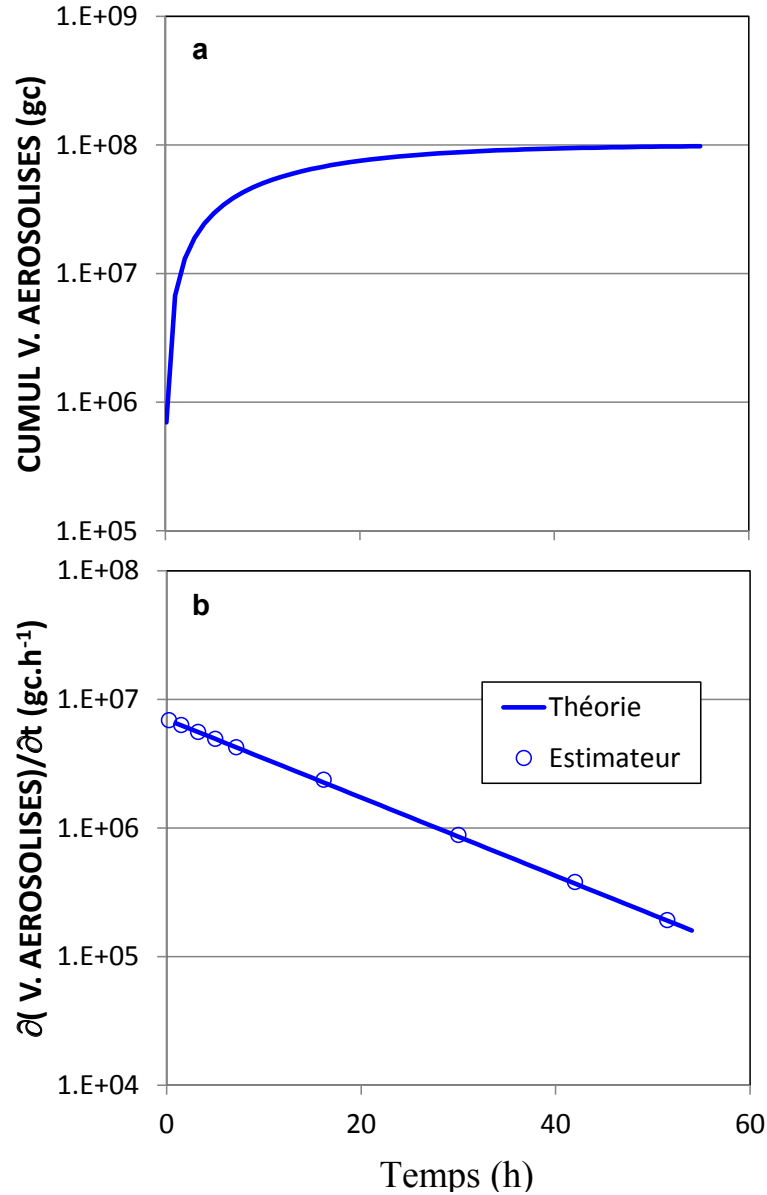
La connaissance de la quantité totale de virus mobilisable au cours du temps $N_{v-m}(t=0)$ et la connaissance du coefficient cinétique d'aérosolisation k_a nous permettent de simuler la quantité cumulée de virus aérosolisée $N_{v-a}(t)$ à la date t et la quantité de virus aérosolisés par unité de temps $\partial N_{v-a}(t)/\partial t$ (gc.h⁻¹) à chaque date t (Figures III.5a-b à titre d'exemple). Cette dernière grandeur n'est pas accessible expérimentalement. Elle peut être estimée à partir de l'aérosolisation cumulée entre les dates t_i (h) et t_{i+1} (h) et affectée à la date $(t_i+t_{i+1})/2$:

$$\overline{\left(\frac{\partial N_{v-a}}{\partial t}\right)}((t_i + t_{i+1})/2) = \frac{(N_{v-a}(t_{i+1}) - N_{v-a}(t_i))}{t_{i+1} - t_i} \quad (\text{III.9})$$

où $\overline{\left(\frac{\partial N_{v-a}}{\partial t}\right)}((t_i + t_{i+1})/2)$ (gc.h⁻¹) est un estimateur de $\left(\frac{\partial N_{v-a}}{\partial t}(t)\right)$ pour $t=(t_i+t_{i+1})/2$. L'exemple proposé dans la Figure III.5b montre que cet estimateur peut correctement évaluer l'émission instantanée de virus à la date proposée, même pour des durées de piégeage de virus $t_{i+1}-t_i$ pouvant aller jusqu'à 12 h, pour des mesures sans incertitude.

L'équation (III.10) peut être généralisée pour n pools du même virus en surface de sol, se distinguant par le type d'adhésion au sol et pouvant être caractérisés chacun par sa taille N_{v-mi} (gc) avec i variant de 1 à n :

$$N_{v-a}(t) = \sum_{i=1}^{n_{pol}} N_{v-mi}(t=0) \times (1 - \exp(-k_{a_i} \times t)) \quad (\text{III.10})$$



Figures III.5 : Simulation des quantités de virus aérosolisés au cours du temps sous tunnel pour $N_{v-m}(t=0)=10^{+8}$ gc et $k_a=0.07 h^{-1}$. (a) (—) Quantité cumulée de virus aérosolisés $N_{v-a}(t)$ en fonction du temps t ; (b) (—) émission instantanée de virus $\partial N_{v-a}(t)/\partial t (gc.h^{-1})$ et (○) estimation de $(\partial N_{v-a}(t)/\partial t)$ à partir des quantités totales de virus aérosolisés à 2 dates successives (dates retenues pour le remplacement des Impingers : 0, 0.5, 2.5, 4, 6, 8.3, 24, 36, 48 et 55 h).

Cette équation peut éventuellement être simplifiée lorsqu'on est en présence d'un pool de virus pouvant être aérosolisé quasiment instantanément de taille N_{v1} et d'un pool de virus suffisamment retenu de taille $N_{v-m}(t=0)$ pour que son aérosolisation doive être décrite par l'équation (III.7) :

$$N_{v-a}(t) = N_{v-m}(t=0) \times (1 - \exp(-k_a \times t)) + N_{v1} \quad (III.11)$$

Lorsque les virus en suspension dans l'atmosphère sont piégés par des Impingers pour les expérimentations sous tunnel, les quantités de virus aérosolisés entre les dates t_i et t_{i+1} sont calculées à partir de la concentration finale de virus piégés dans l'Impinger $C_{v-imp} (gc.L^{-1})$ à la date t_{i+1} :

$$N_{v-a}(t_{i+1}) - N_{v-a}(t_i) = \left(\frac{C_{v-imp} \times w_{imp}}{d_{pomp} \times (t_{i+1} - t_i)} \right) \times v_{wind} \times S_{tun} \times (t_{i+1} - t_i) \times 1000 \quad (III.12)$$

où w_{imp} est le volume de solution de piégeage dans l'Impinger (L), d_{pomp} le débit d'air traversant l'Impinger ($L.h^{-1}$), v_{wind} la vitesse du vent ($m.h^{-1}$), et S_{tun} la section du tunnel orthogonale à son axe (m^2). En absence de ré-aérosolisation, la quantité de virus aérosolisés entre les dates t_i et t_{i+1} est directement proportionnelle à la concentration de virus dans l'impinger.

Nous avons fait l'hypothèse que les mesures de RT-qPCR faites à chaque date t_{i+1} suivaient une distribution log-normale ; sous hypothèse que d'autres facteurs n'affectent pas la variabilité des mesures, les quantités estimées de virus aérosolisés $N_{v-a}(t_{i+1}) - N_{v-a}(t_i)$ entre 2 dates successives t_i et t_{i+1} suivent alors aussi une distribution log-normale, et les logarithmes des concentrations et des quantités de virus aérosolisés suivent alors une loi normale ayant le même écart-type $\sigma_{a-\log 10}$.

A partir d'une simulation parfaite correspondant à la Figure III.5, nous avons simulé 100 expériences numériques en considérant que les mesures de RT-qPCR faites à chaque date t_{i+1} suivaient une distribution log-normale. Nous avons supposé qu'il y avait 3 réplicats à chaque date, bien que leur nombre ait en fait fluctué de 1 à 9. Nous avons par ailleurs supposé que les écarts types $\sigma_{a-\log 10}$ sur les \log_{10} des quantités mesurées ne dépendaient pas de l'espérance des quantités aérosolisées.

Pour chaque date de changement d'Impinger, l'espérance de la distribution sur les \log_{10} des quantités de virus aérosolisés entre 2 dates de changement d'Impinger à partir de l'espérance sur la distribution réelle ($\Delta_{cumul} = N_{v-a}(t_{i+1}) - N_{v-a}(t_i)$) et de l'écart-type sur les \log_{10} est la suivante :

$$E(\log_{10}(\Delta_{cumul})) = \log_{10}(N_{v-a}(t_{i+1}) - N_{v-a}(t_i)) - \frac{\sigma_{a-\log 10}^2}{2} \quad (III.13)$$

L'écart-type utilisé pour les expériences numériques a été estimé à partir des expérimentations réelles sous tunnels : à chaque date où c'était possible, nous avons calculé d'une part une estimation de $\sigma_{a-\log 10}$ sur les \log_{10} des mesures, d'autre part l'écart entre la valeur maximale et la valeur minimale (i.e. l'étendue) de la distribution des mesures.

Pour chacune de ces 100 expériences numériques, 2 options ont alors été envisagées pour évaluer la quantité cumulée de virus aérosolisés :

- Option 1 : ajustement d'une équation du type de l'équation (III.8) sur les quantités cumulées de virus aérosolisés au cours du temps (cf. Figure III.4a) par minimisation de la somme des carrés des écarts entre données simulées par cette équation et données pour chaque expérience numérique avec comme résultat une estimation directe de N_{v-m} et de k_a ;
- Option 2 : ajustement d'une droite par régression linéaire classique aux \log_{10} des quantités de virus aérosolisés entre 2 dates successives (cf. Figure III.4b) pour chaque expérience numérique. Le coefficient directeur de la droite de régression est directement un estimateur de k_a , et l'ordonnée à l'origine de la même droite est un estimateur du produit $k_a \times N_{v-m}(t=0)$; on a supposé que le rapport des 2 estimations pouvait servir d'estimateur à $N_{v-m}(t=0)$.

Les résultats des 2 étapes précédentes (cf. résultats dans la section III.3.) ont montré qu'on pouvait expliquer l'essentiel des variations des quantités de virus aérosolisables sur un mode cinétique $N_{v-m}(t=0)$ en fonction de la vitesse du vent, de la température de surface du sol et de la qualité de l'eau d'irrigation ; à l'inverse, aucune tendance ne s'est dégagée pour expliquer les variations du coefficient cinétique d'aérosolisation k_a et les quantités de virus aérosolisés presque instantanément en début de suivi N_{v1} .

En utilisant le formalisme mathématique proposé dans la section III.3. (cf. équation (III.19)) et après avoir remplacé les valeurs numériques trouvées par des coefficients a , b et c à estimer (et supposées uniques pour l'ensemble des expériences sous tunnels), nous obtenons alors un formalisme mathématique applicable à l'ensemble des expériences sous tunnels :

$$N_{v-m}(t=0) = \left(a \times v_{wind}^2 \times \exp(-b \times T) \right) + c \times I_{ww} \quad (III.14)$$

Dix-sept paramètres doivent être estimés : les 3 coefficients a , b et c , 7 valeurs de N_{v1} correspondant à chacune des 7 expériences et renommées $N_{v1}(j)$ dans la suite, j étant le numéro de l'expérience, et 7 valeurs de k_a correspondant à chacune des 7 expériences et renommées $k_a(j)$ dans la suite. En pratique, on estime simultanément les 17 paramètres listés ci-dessus par ajustement des logarithmes des quantités simulées de virus aérosolisés aux logarithmes des quantités observées entre la mise en place d'un Impinger à la date t_i et son retrait à la date t_{i+1} . La quantité de virus aérosolisés entre ces dates est estimée par les équations suivantes avec $\Delta t = t_{i+1} - t_i$:

- pour le premier intervalle de temps ($t=0$) faisant intervenir un flux quasi-instantané initial :

$$N_{v-a}(j, \Delta t) - N_{v-a}(j, 0) = N_{v1}(j) + \left(\left(a \times v_{wind}^2 \times \exp(-b \times T) \right) + c \times I \right) \times (1 - \exp(-k_a(j) \times \Delta t)) \quad (III.15)$$

- pour toute date ultérieure ($t > 0$), ne faisant pas intervenir de flux quasi-instantané :

$$\hat{N}_{v-a}(j, t_{i+1}) - \hat{N}_{v-a}(j, t_i) = \left(\left(a \times v_{wind}^2 \times \exp(-b \times T) \right) + c \times I \right) \times (\exp(-k_a(j) \times t_i) - \exp(-k_a(j) \times t_{i+1})) \quad (III.16)$$

Ayant à ajuster des données très variables suivant *a priori* une distribution log-normale avec des erreurs de type multiplicatif, le logarithme de l'erreur correspondant à une variable aléatoire de variance constante, l'ajustement s'est fait par minimisation de l'expression suivante (Eq III.17) :

$$S = \sum_{j=1}^{n_r} \sum_{i=0}^{n_t-1} \left(\ln(\hat{N}_{v-a}(t + \Delta t) - \hat{N}_{v-a}(t)) - \ln(N_{v-a}(t + \Delta t) - N_{v-a}(t)) \right)^2 \quad (III.17)$$

où j est le numéro de l'expérience variant de 1 à n_e , i est le numéro de l'intervalle de temps parmi les n_t intervalles de temps pour l'expérience i . La qualité de l'ajustement a été évaluée par la qualité de la relation entre quantité simulée et quantité observée de virus aérosolisés sur chaque intervalle de temps.

III.3. Résultats et discussions

III.3.a. Incertitudes et biais liés aux métrologies et protocoles expérimentaux

III.3.a.i. Qualification des Impingers et des filtres

Concernant les Impingers, 2 types de processus peuvent *a priori* induire une sous-estimation de l'aérosolisation des virus : un piégeage imparfait des virus dans la solution de piégeage, et une ré-aérosolisation des virus préalablement piégés (Lin et al., 1997) pouvant être favorisés pour certains colloïdes par leur caractère hydrophobe (Syngouna et Chrysikopoulos, 2010) ou par la création avec le bullage d'hydrométéores (gouttes d'eau en suspension dans l'air) chargés en virus et entraînés hors de l'Impinger.

L'importance de la ré-aérosolisation a été évaluée à partir des pertes en virus dans le 1^{er} des 3 Impingers en série dans les expériences de qualification des Impingers au laboratoire (Tableau III.2). Il n'y a de corrélation ($P > 0.05$) ni entre quantité initiale de solution de piégeage dans l'Impinger et ré-aérosolisation, ni entre débit d'air et ré-aérosolisation. Si l'on fait la moyenne de l'ensemble des estimations, on aboutit à un rapport moyen de 0.53 entre concentration finale (après 6 h de bullage) et concentration initiale dans le 1^{er} des 3 Impingers : au bout de 6 h, 47% des virus initialement présents dans l'Impinger ont été ré-aérosolisés (soit 10^9 virus aérosolisés). On peut simuler ce phénomène grâce à l'équation (III.2) réduite à la seule ré-aérosolisation pour un Impinger initialement contaminé en virus avec $k_h = 0.11$.

Tableau III.2 : Rapports entre concentration finale (après 6 h de bullage) et concentration initiale dans le 1^{er} des 3 Impingers pour 2, 3 et 2 expériences avec respectivement 10, 20 et 40 mL de solution de PBS diluée au 10^{ème} initialement dans le 1^{er} Impinger.

Expérience (N°)	w_{imp} (mL)	Débit (L air.min ⁻¹)	$C_{v-t=6h}/C_{v-t=0}$	$\overline{C_{v-t=6h}/C_{v-t=0}}$
1	10	3.77	0.24	0.51
2		4.15	0.79	
3		2.69	0.61	
4	20	3.73	0.25	0.46
5		3.44	0.52	
6	40	3.41	0.61	0.66
7		3.38	0.71	

L'efficacité du piégeage dans les Impingers a été évaluée à partir des rapports de concentration en virus dans les Impingers 2 et 3 pour des durées assez faibles pour que la ré-aérosolisation n'affecte pas trop ces concentrations ; au bout de 0.5, 1, 2 et 4 h de fonctionnement, la ré-aérosolisation aboutit à des concentrations respectivement égales à 97, 95, 90 et 80% de ce que serait l'accumulation en absence de ré-aérosolisation pour une valeur de $k_h = 0.11$. Une estimation du coefficient de piégeage k_p (Eq III.18) peut être déduite des rapports de concentrations données pour les 4 premières heures des expériences de qualification en laboratoire (Tableau III.3) :

$$k_p = -1 - \frac{C_{v-imp3}}{C_{v-imp2}} \quad (III.18)$$

Tableau III.3 : Rapports à différentes dates entre concentration en virus dans les Impingers 3 et 2.
(-) : absence de mesure sur les Impinger 3 ou/et 2 montre l'absence

Expérience (N°)	w_{imp} (mL)	$C_{v-imp3}(t)/C_{v-imp2}(t)$			
		0.5 h	1 h	2 h	4 h
1	10	-	-	-	-
2	10	-	-	-	-
3	20	-	0.03	-	0.62
4	20	0.34	0.005	2.8	0.35
5	20	0.75	1.7	0.29	0.19
6	40	0.35	-	0.12	-
7	40	-	0.19	-	0.13

À ce niveau, la qualité de nos données laissait à désirer et il a été difficile d'avoir une estimation précise de ce coefficient de piégeage, au vu de la très grande variabilité des rapports C_{v-imp3}/C_{v-imp2} : les estimations de k_p sont comprises entre 1.78 (!) et 0.99. En excluant les 2 valeurs négatives (bien évidemment) aberrantes, les 1^{er} et 3^{ème} quartiles de la distribution sont égaux respectivement à 0.65 et 0.87, et la médiane est de 0.77. Les ordres de grandeurs obtenus sont en accord avec la littérature : l'Impinger AGI-30, moins performant avec une projection d'air au-dessus du liquide (sans bullage), a une efficacité de piégeage de 82% pour des particules de taille supérieure au μm et un flux d'air de 12.5 L.min^{-1} (Han et Mainelis, 2012), mais aurait une efficacité de piégeage beaucoup plus faible (~12%) pour des particules de 25 nm (bactériophages MS2 et T3) et un débit d'air de 4 L.min^{-1} (Hogan et al., 2005). Peu d'études ont évalué les performances de l'AGI-4 : Dart et Thornburg (2008) citent des résultats de Lin et al. (1997) donnant pour ce biocollecteur avec comme liquide de collecte de l'eau distillée, une efficacité de collecte de plus de 90 % pour des particules (particules de polystyrène latex) de tailles comprises entre 0.2 et $2 \mu m$.

Nous avons voulu évaluer en quoi l'efficacité du piégeage et la ré-aérosolisation affectaient les évolutions expérimentales et leur analyse, notamment les estimations des paramètres $N_{v-m}(t=0)$, N_{v1} et k_a . Pour ce faire, les données de l'expérience n°3 sous tunnel ont été analysées parallèlement, à l'état « brut » ou après correction en utilisant le facteur défini dans l'équation (III.5) avec $k_p=0.77$ et $k_h=0.11$, bien que les débits des pompes alimentant les Impinger n'aient pas été tout à fait identiques entre expériences de laboratoire et suivis sous tunnel. Les résultats de cette analyse sont présentés dans la section III.2.b.i : les estimations de k_a ne sont pas très affectées par la correction des données brutes, au contraire des estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et de N_{v1} qui sont multipliées par un facteur 2 environ avec ces corrections. Pour la suite du travail, nous avons opté pour un traitement des données sans correction, au vu des incertitudes sur les valeurs de k_p et k_h . Les conclusions finales tiennent toutefois compte des biais sur les paramètres estimés.

III.3.a.ii. Incertitudes sur l'aérosolisation dans la méthode des tunnels ventilés

Pour simuler des expériences numériques, il nous fallait estimer l'écart-type $\sigma_{a-\log10}$ sur les \log_{10} des quantités aérosolisées calculées à partir des concentrations de virus mesurées dans la solution des Impingers.

En utilisant les expérimentations réelles sous tunnels, nous avons estimé, à chaque date où c'était possible, sur les \log_{10} des mesures de quantités d'une part l'écart entre la valeur maximale et la valeur minimale (i.e. l'étendue), d'autre part l'écart-type de la distribution des mesures (Figure III.6a).

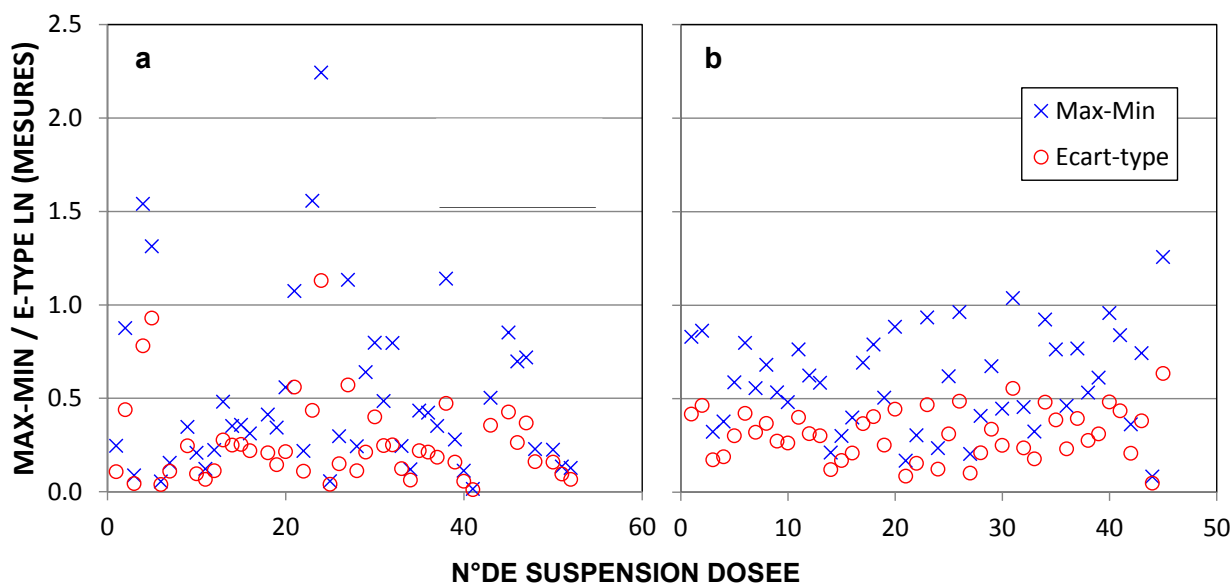


Figure III.6 : Variabilité des \log_{10} des quantités de virus contenues dans chaque Impinger en fin de période d'utilisation avec (x) l'étendue (valeur maximale – valeur minimale) et (o) l'écart-type des mesures. (a) Estimations à partir des mesures réalisées sur la suspension contenue dans chaque Impinger en fin d'utilisation ; (b) estimations à partir des expériences numériques pour $\sigma_{a-\log_{10}}=0.35$.

On constate que les estimations de l'écart-type sont presque toujours inférieures à $0.5 \log_{10}$, voire inférieures à 0.35 (74% des écarts-types des estimations). Nous avons retenu cette dernière valeur (0.35). On aboutit alors à des distributions simulées d'étendue et d'écart-type pour les \log_{10} des quantités de virus aérosolisés sur chaque intervalle de mesure (Figure III.6b) similaires aux distributions réelles (Figure III.6a), bien que les valeurs soient moins dispersées autour de valeurs moyennes. Quelques tests non reportés dans ce manuscrit montrent que cet écart entre réalité expérimentale et simulations résulte au moins pour partie du nombre uniforme de répétitions dans les expériences numériques (3), en contraste du nombre de répétitions réelles variant entre 1 et 9.

Les 100 expériences numériques alors simulées à partir de la situation considérée dans la Figure III.5 ont abouti à chaque date à des estimations des quantités cumulées des virus aérosolisés (Figure III.7a) et de l'aérosolisation « instantanée » de virus dans l'atmosphère (Figure III.7b).

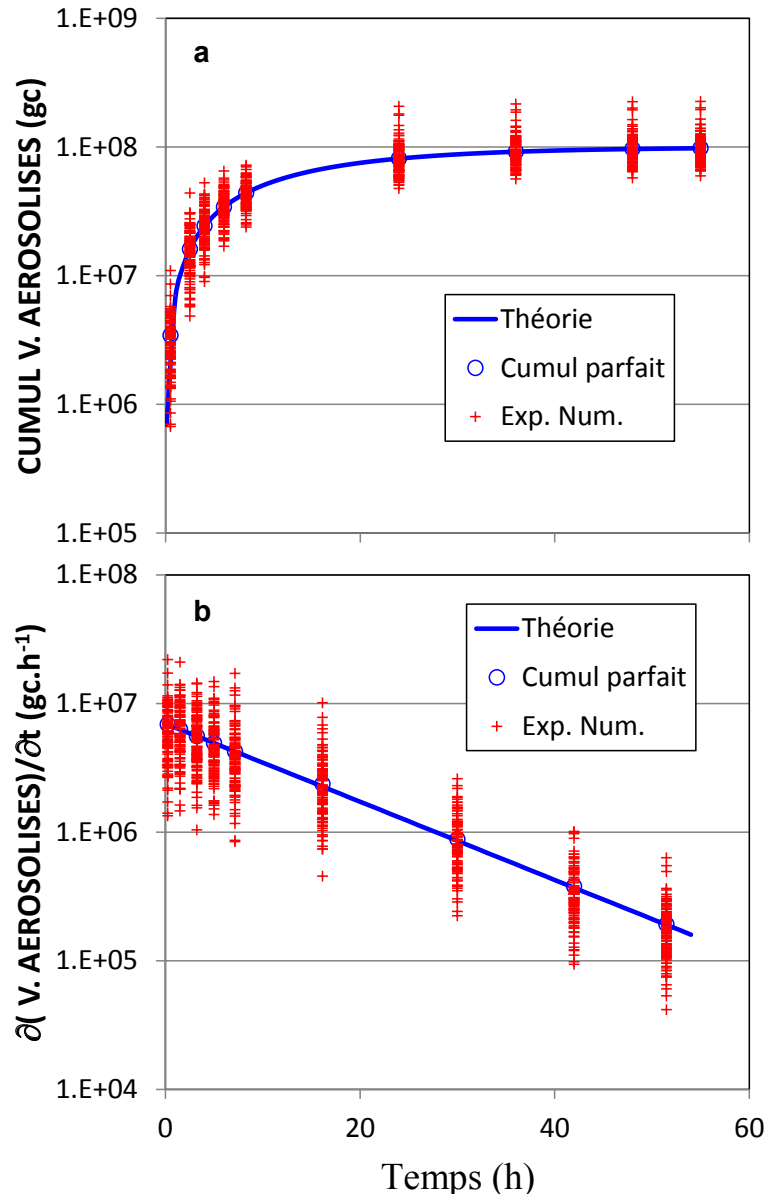


Figure III.7 : Distribution des valeurs issues des 100 expériences numériques (+) au regard de la distribution théorique des valeurs (—), et des dérivées estimées des quantités de virus aérosolisés par différences finies (○) à partir des quantités totales de virus aérosolisés entre 2 dates successives (dates retenues : 0, 0.5, 2.5, 4, 6, 8.3, 24, 36, 48 et 55 h). Calculs pour une aérosolisation théorique avec $N_{v-m}(t=0)=10^{+8}$ gc et $k=-0.07$ h⁻¹. (a) Quantité cumulée de virus aérosolisés $N_{v-a}(t)$ en fonction du temps t ; (b) émission instantanée de virus $\partial N_{v-a}(t)/\partial t$ (gc.h⁻¹).

Trois exemples d'ajustements basés sur l'option 1 sont proposés dans la Figure III.8a ; de la même façon, 3 exemples d'ajustements basés sur l'option 2 sont proposés dans la Figure III.8b.

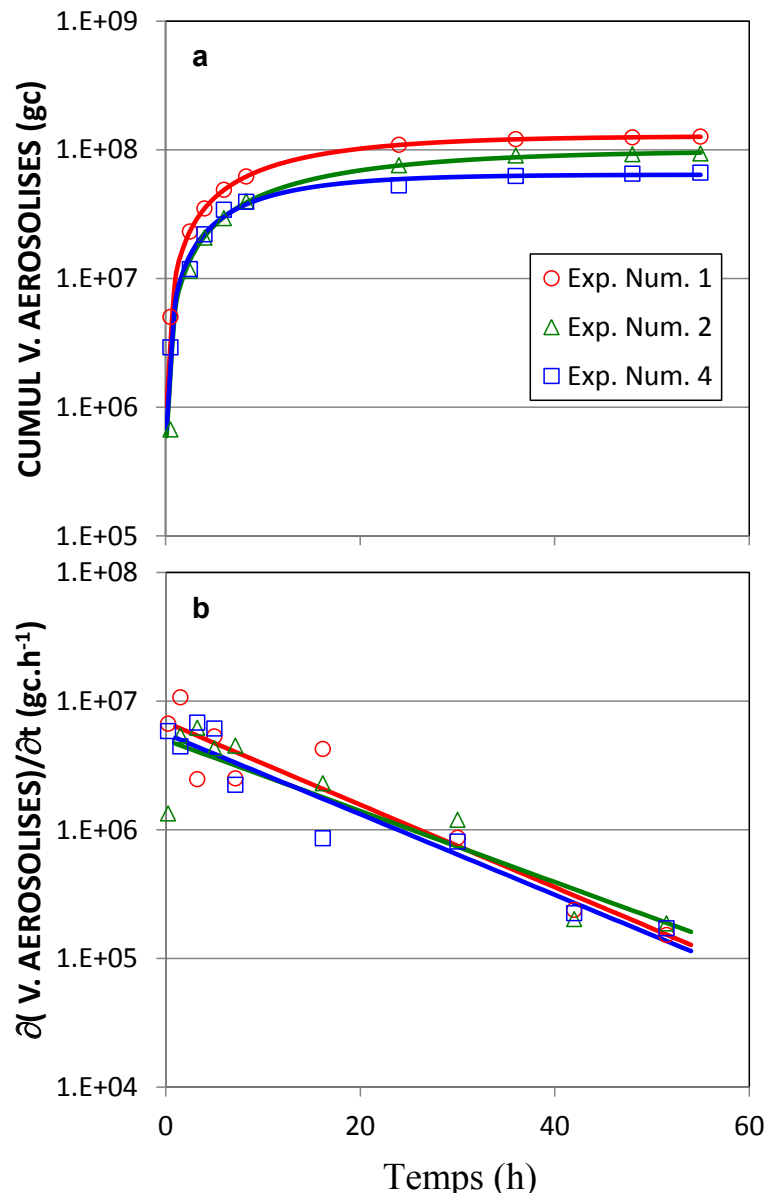


Figure III.8 : Trois expériences numériques sous tunnel en rouge, vert et bleu, ayant pour vraies valeurs $N_{v-m}(t=0)=10^{+8}$ gc et $k=0.07$ h⁻¹. (Symboles) valeurs expérimentales simulées ; (ligne continue) simulations après ajustement selon l'option 1 (a), ou l'option 2 (b).

La comparaison des estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a entre les 2 méthodes fait apparaître la supériorité de la méthode basée sur l'utilisation des flux « instantanés » pour l'estimation de ces 2 valeurs, notamment en termes de variabilité plus faible des estimations (Figure III.9 et Tableau III.4). Avec cette méthode, il semble que la quantité cumulée de virus aérosolisés $N_{v-m}(t=0)$ puisse être estimée avec une précision meilleure qu'avec un facteur 2 (i.e. l'aérosolisation réelle serait entre 0.5 fois et 2 fois la valeur estimée).

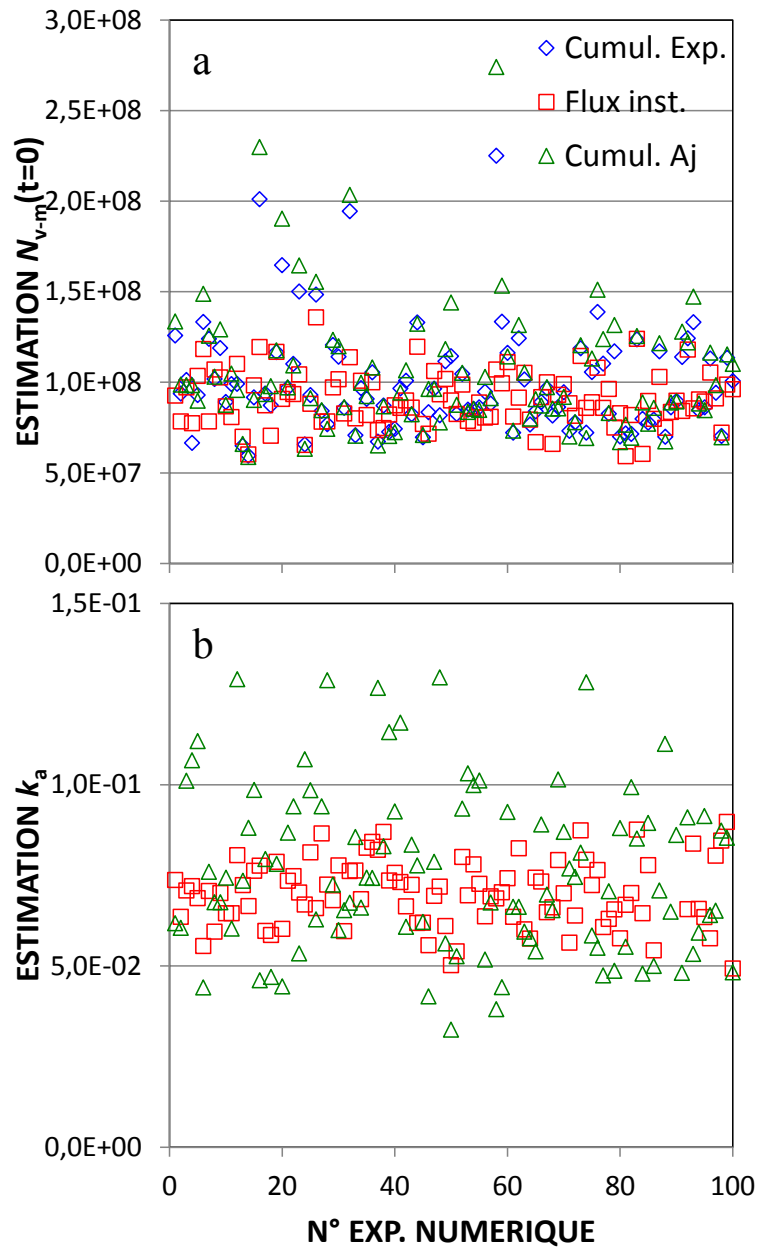


Figure III.9 : Estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a suivant l'option 1 (a) ou l'option 2 (b).

A ce stade de l'analyse, nous ne pouvons pas exclure que l'estimation de $N_{v-m}(t=0)$ par l'utilisation des flux « instantanés » soit entachée d'un biais (Tableau III.4) mais, si ce biais est confirmé, il resterait très petit au regard de l'incertitude sur l'estimation de $N_{v-m}(t=0)$. La méthode basée sur l'utilisation des flux « instantanés » semble donner des estimations non biaisées de k_a .

Tableau III.4 : Estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a par différentes méthodes (les écart-types sur ces estimations sont donnés entre parenthèses en dessous des estimations moyennes de ces grandeurs).

	Expériences numériques - aérosolisation sur 55 h	Ajustement sur les flux « instantanés »	Ajustement sur les quantités cumulées
$N_{v-m}(t=0)$	$9.98 \cdot 10^7$ ($2.85 \cdot 10^7$)	$9.06 \cdot 10^7$ ($1.5 \cdot 10^7$)	$1.04 \cdot 10^8$ ($3.46 \cdot 10^7$)
k_a	-	$7.01 \cdot 10^{-2}$ ($8.95 \cdot 10^{-3}$)	$7.61 \cdot 10^{-2}$ ($2.28 \cdot 10^{-2}$)

Ainsi, pour une aérosolisation pouvant être décrite par l'équation (III.7) dans des expérimentations sous tunnel, il semble tout à fait possible d'estimer la quantité de virus pouvant être remis en suspension dans l'atmosphère à un facteur inférieur à 2 près (Figure III.9a et Figure III.10) grâce à l'utilisation des flux « instantanés ». Cette méthode présente l'avantage de permettre un travail pour un jeu incomplet de données (un accident sur un Impinger ...) ; par contre et concernant l'estimation de $N_{v-m}(t=0)$, sa validité est plus fortement conditionnée par la validité des hypothèses du modèle (conditions constantes sur la période analysée pour que l'équation (III.7) puisse être intégrée et aboutir à l'équation (III.8)). Il est toujours possible de recourir à la méthode basée sur l'analyse des quantités cumulées. Elle amène parfois à des estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a éloignées des valeurs réelles.

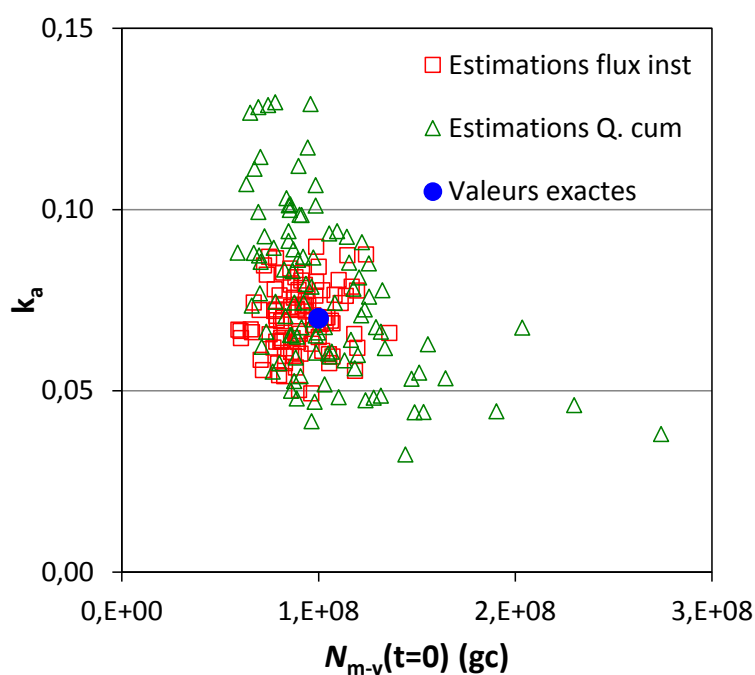


Figure III.10 : Estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a par l'utilisation des quantités aérosolisées cumulées (option 1) et des flux instantanés (option 2).

Des limites de 2 types au modèle peuvent être envisagées :

- le changement des conditions dans le temps (humidité de surface du sol, vitesse du vent, température ...) ;
- la distinction de pools de virus suivant leur niveau d'attachement ou de piégeage par le sol. On peut envisager des virus à peine retenus par le sol (pouvant s'envoler au moindre mouvement d'air), d'autre moyennement retenus, et d'autres fortement très fortement retenus.

A titre d'illustration du 2^{ème} type de limites envisagées, nous avons considéré 3 pools viraux de tailles et de coefficients cinétiques d'aérosolisation donnés (Tableau III.5).

Tableau III.5 : Définition de 3 pools de virus suivant leur niveau d'attachement au sol.

Virus	Pool 1*	Pool 2**	Pool 3***
$N_{v-m}(t=0)$	$3 \cdot 10^{+7}$	$3 \cdot 10^{+7}$	$4 \cdot 10^{+7}$
k_a	2.00	0.20	0.02

* : pool aérosolisé en moins de 2 h ; ** : pool aérosolisé en 20 h environ ; *** : pool partiellement aérosolisé en fin d'expérimentation sous tunnel.

La simulation sans aléa numérique de l'aérosolisation cumulée des virus avec l'équation (III.10) n'est alors plus ajustable parfaitement par un modèle n'ayant qu'un ou 2 pools viraux (Figure III.11).

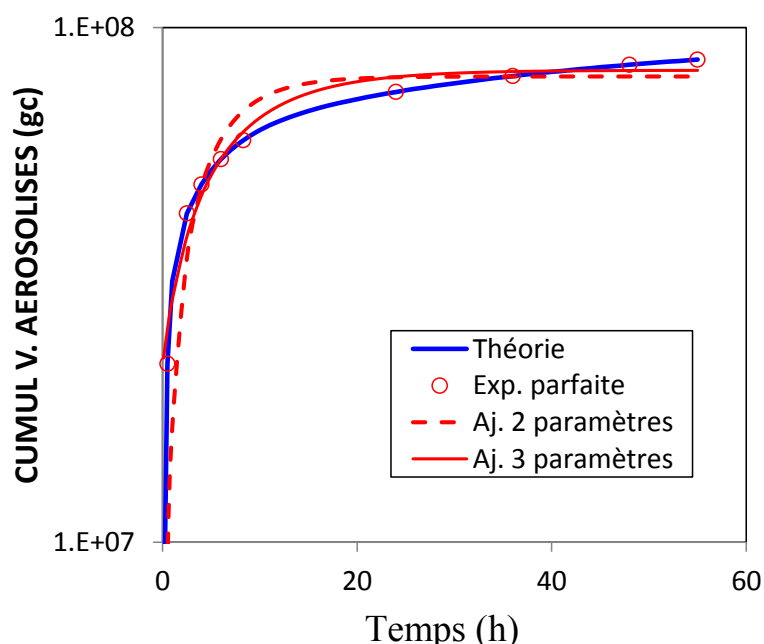


Figure III.11 : Modèle d'aérosolisation avec 3 pools viraux respectivement facilement ($k_a=2$), moyennement ($k_a=0.2$) et difficilement ($k_a=0.02$) aérosolisés dans l'atmosphère. Ajustements en considérant 1 pool viral unique avec 2 paramètres à estimer (cf. Equation (III.10)) ou 2pools viraux avec 3 paramètres à estimer (cf. Equation (III.11)).

Les 2 ajustements effectués permettent des simulations légèrement biaisées par rapport à la réalité. Les paramètres ajustés (Tableau III.6) amènent aux commentaires suivant :

- l'estimation de $N_{v-m}(t=0)$ pour l'ajustement à 2 paramètres est très proche de la somme $N_{v-m}(t=0)+N_{v1}$ pour l'ajustement à 3 paramètres. Ces valeurs (environ $8 \cdot 10^{+7}$ gc) sont inférieures à la taille totale du pool de virus pouvant être aérosolisés (10^{+8} gc), mais l'écart s'explique en partie par les virus du pool 3 ($k_a=0.02$) non encore aérosolisés en fin d'expérience numérique (55 h). L'estimation de N_{v1} est proche de la taille du pool des virus les plus faciles à aérosoliser ;
- les estimations de k_a sont dans la gamme des valeurs imposées sans plus. L'estimation avec ajustement de 2 paramètres est supérieure à l'estimation avec ajustement de 3 paramètres car le coefficient N_{v1} peut être assimilé à une partie du pool des virus les plus faciles à aérosoliser ; l'ajustement des paramètres $N_{v-m}(t=0)$ et k_a se fait alors sur le devenir des virus les moins faciles à aérosoliser.

Tableau III.6 : Paramètres estimés à partir d'une simulation numérique avec 3 pools de virus (cf. Tableau III.5) par ajustement portant sur les quantités aérosolisées cumulées en tenant compte de 2 pool viraux (ajustement à 3 paramètres) ou d'1 seul pool viral (ajustement à 2 paramètres).

Nombre de paramètres estimés	$N_{v-m}(t=0)$	k_a	N_{v1}
2	$8.04 \cdot 10^{+7}$	0.23	-
3	$6.06 \cdot 10^{+7}$	0.13	$2.20 \cdot 10^{+7}$

En conclusion à cette analyse, la modélisation simplifiée de l'aérosolisation de virus et la réalisation d'expériences numériques réalistes au vu des incertitudes en RT-qPCR ont montré que :

- la comparaison des estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a par les 2 méthodes envisagées montre que la méthode basée sur les flux « instantanés » fournit des estimations plus précises de ces 2 paramètres. Le simple cumul expérimental des quantités aérosolisées (i.e. sans passer par l'ajustement d'un modèle) aboutit certes à des estimations non biaisées, mais amène aussi à un fort étalement des valeurs ;
- en utilisant l'option 2 (analyse des flux instantanés), l'incertitude sur les flux cumulés pour 55 h d'aérosolisation est inférieure à $5 \cdot 10^{+7}$ gc, soit moins de 50% de la quantité totale réelle de virus pouvant être aérosolisés ;
- en utilisant l'option 2 (analyse des flux instantanés), l'incertitude sur le coefficient cinétique d'aérosolisation est inférieure à 40 % de la valeur estimée. Une valeur de k_a égale à 0.07 aboutit à la mise en suspension dans l'atmosphère de plus de 90% des virus re-mobilisables en moins de 33 h.

Toutefois et au-delà des incertitudes, notre travail a certainement simplifié la réalité. Il est fort probable que, pour une quantité totale de virus apportée par irrigation (N_{v-t}), la quantité de virus pouvant être remis dans l'atmosphère ($N_{v-m}(t=0)$) doit être subdivisée en plusieurs compartiments selon l'état des virus à la surface du sol (notamment le niveau d'adhésion des virus au sol).

III.3.b. Résultats des expérimentations sous tunnels

III.3.b.i. *Estimation des paramètres sur l'expérience n°3 : impacts des options et des corrections*

A titre d'exemple, nous présentons une analyse détaillée de l'expérience n°3 sous tunnel (Figure III.12a-d). Pour cette expérience, la Figure III.12a montre qu'on ne peut pas ajuster le modèle présenté dans la section III.1.c.ii en ne considérant qu'un seul pool de virus (Eq. (III.7) et (III.8)) : l'ajustement avec estimation de 2 paramètres ($N_{v-m}(t=0)$ et k_a) simule une aérosolisation biaisée par rapport aux données expérimentales (Figure III.12a). Il est nécessaire de prendre en compte plusieurs pools, au minimum 2 au vu de la possibilité d'ajuster un modèle à 3 paramètres (cf. Eq. (III.11)).

En ne tenant pas compte de la première valeur de flux (correspondant à l'aérosolisation très rapide d'un pool de virus égal à N_{v1} (gc), l'analyse des flux instantanés (Figure III.12b) confirme qu'on peut alors très bien décrire ces flux dans le temps par un modèle avec un seul pool de virus, et ce malgré les variations pendant la durée de l'expérimentation de la température et de l'humidité de surface du sol (Figure III.12c), voire aussi de la vitesse du vent (Figure III.12d). Ce résultat peut paraître surprenant au vu de la baisse importante d'humidité de surface du sol entre 0 et 8 h (respectivement de 18 à 10% volumique) (Figure III.12c) ; toutefois, ces variations concernent en réalité une couche de sol d'épaisseur mal définie mais probablement de l'ordre de 2-3 cm, voire au-delà, tandis que l'humidité affectant réellement l'aérosolisation des virus est celle à l'interface sol-atmosphère, humidité qui a probablement diminué beaucoup plus rapidement juste après l'irrigation contaminante. Les fluctuations autour de la droite de régression sont du même ordre de grandeur que celles observées avec les expériences numériques (cf. Figure III.8b).

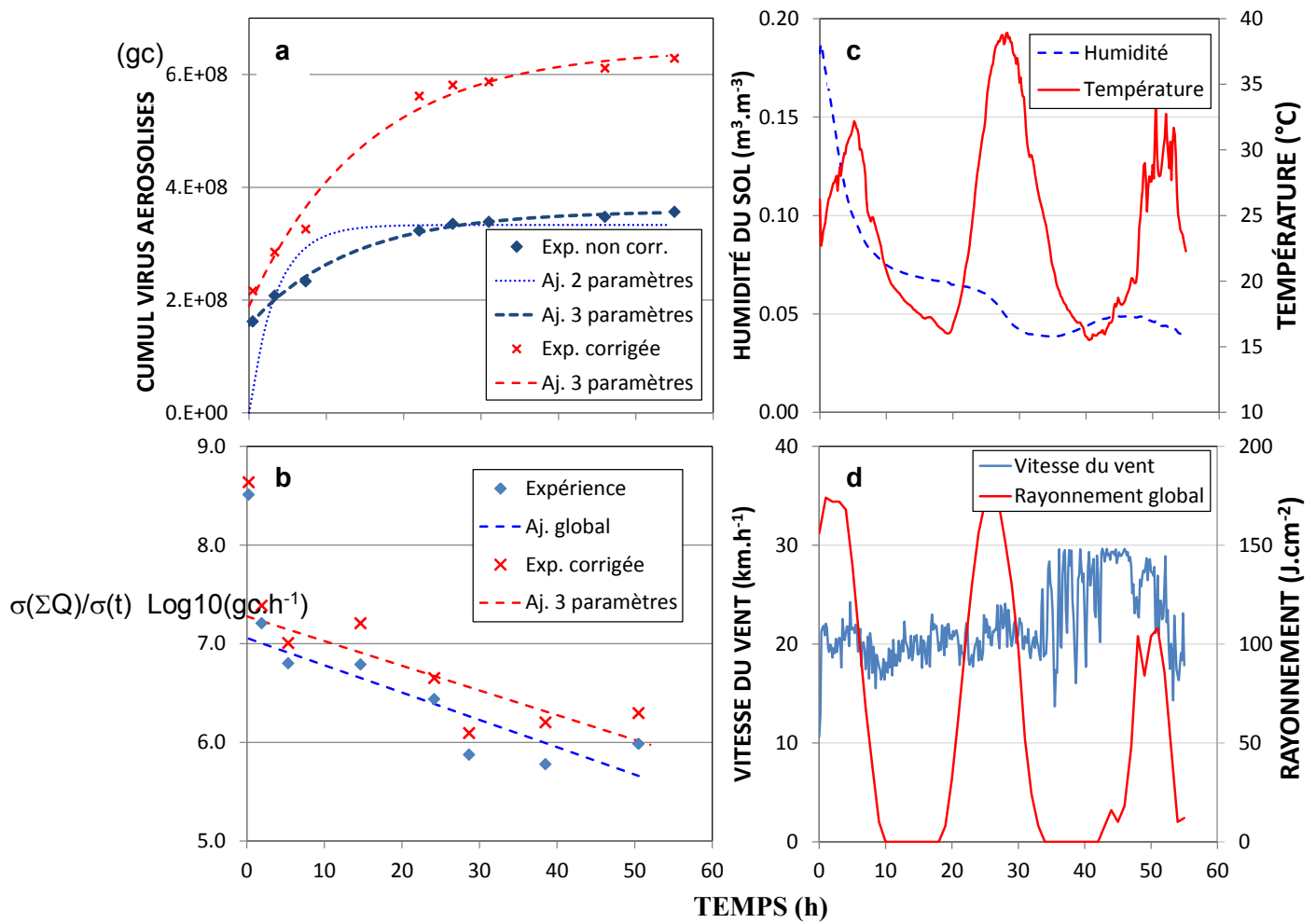


Figure III.12 : Exemple de suivi sous tunnel : expérience n°3 (vitesse du vent : 22 km.h⁻¹ ; apport de 9.5L d'eau du robinet avant d'apporter 1 L d'eau pure contaminée). (a) Quantités aérosolisées cumulées, (b) flux instantanés, (c) température de surface du sol et humidité des 3 premiers centimètres du sol, et (d) vitesse du vent. Pour les figures (a) et (b) : (Symboles) valeurs expérimentales ; (ligne pointillée) ; (ligne tiret) ; simulations après ajustement.

Pour cette expérience sous tunnel, 3 estimations de la taille du pool des virus pouvant être aérosolisés ont été obtenues. Avec l'option 1 (i.e. en utilisant le cumul d'aérosolisation), on obtient $N_{v-m}(t=0) = 3.3 \cdot 10^{+8}$ gc pour 2 paramètres estimés, ou $N_{v-m}(t=0) = 2.0 \cdot 10^{+8}$ gc et $N_{v1} = 1.5 \cdot 10^{+8}$ gc pour 3 paramètres estimés ; la somme des 2 dernières valeurs ($3.5 \cdot 10^{+8}$ gc) est proche de l'estimation globale du pool viral en estimant 2 paramètres, l'écart étant conforme au biais observé entre simulations et données expérimentales en fin de suivi (Figure III.9a). La 3^{ème} estimation s'est faite à partir de l'analyse des flux instantanés (option 2) sans le 1^{er} flux correspondant à l'aérosolisation presque instantanée pendant la première demi-heure ; on aboutit alors à une valeur ($1.8 \cdot 10^{+8}$ gc) très proche de la taille du pool aérosolisé de manière cinétique avec l'ajustement à 3 paramètres pour l'option 1 ($2.0 \cdot 10^{+8}$) ; avec cette même option 2, on peut toutefois décomposer l'émission au cours de la première demi-heure après estimations de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a en une émission associée à ce même pool cinétique de virus et une émission instantanée de N_{v1} virus (cf. Tableau III.7). Pour l'expérience n°3, cette estimation de N_{v1} ($1.6 \cdot 10^{+8}$ gc) est très proche de la valeur de N_{v1} estimée pour l'ajustement à 3 paramètres dans l'option 1.

Les 3 estimations du coefficient cinétique d'aérosolisation k_a sont aussi cohérentes entre elles : avec l'option 1, $k_a = 0.287 \text{ h}^{-1}$ pour 2 paramètres estimés et $k_a = 0.076 \text{ h}^{-1}$ pour 3 paramètres estimés ; avec l'option 2, $k_a = 0.063 \text{ h}^{-1}$. La différence entre les 2 estimations *via* l'option 1 est aisée à comprendre : lorsqu'on estime 2 paramètres, on met l'ensemble des virus dans un pool unique et le coefficient cinétique « apparente » d'aérosolisation tient compte simultanément de ceux aérosolisés presque instantanément ($k_a > 2$ en ordre de grandeur) et de ceux aérosolisés sur un vrai mode cinétique ($k_a < 1$ en ordre de grandeur, k_a pouvant être très petit). La valeur de $k_a = 0.076 \text{ h}^{-1}$ pourrait correspondre à une estimation réaliste du coefficient cinétique d'aérosolisation pour le pool de virus non remis en suspension dans l'air spontanément (Figure III.12a) ; ce coefficient caractériserait un pool de virus aérosolisés à 90% en 30 à 31 h dans des conditions environnementales proches de celles du tunnel 3 ; comme une confirmation de cette interprétation, cette estimation de k_a est très proche de la dernière estimation de k_a par l'option 2 ($k_a = 0.064 \text{ h}^{-1}$ avec alors un pool de virus aérosolisés à 90% en 36 h).

Si l'on corrige les données pour tenir compte de l'efficacité du piégeage (avec $k_p=0.77$) et de la ré-aérosolisation (avec $k_h=0.11$), on obtient avec l'option 1 $N_{v-m}(t=0) = 4.6 \cdot 10^{+8} \text{ gc}$, $N_{v1} = 1.9 \cdot 10^{+8} \text{ gc}$ et $k_a = 0.066 \text{ h}^{-1}$ pour 3 paramètres estimés. Avec l'option 2 on obtient $N_{v-m}(t=0) = 3.3 \cdot 10^{+8} \text{ gc}$ et $k_a = 0.058 \text{ h}^{-1}$. Cette première analyse montre que le coefficient cinétique d'aérosolisation n'est pas forcément très affecté par le biais sur les données expérimentales. A l'inverse, la taille des pools viraux aérosolisables doit probablement être multipliée par un facteur de l'ordre de 2 sous réserve que nos estimations grossières de k_p et k_h soient réalistes.

En supposant qu'on a apporté initialement $1.46 \cdot 10^{+10}$ virus sous chaque tunnel, les quantités de virus aérosolisables dans les conditions de l'expérience seraient alors comprises entre 2.3% et 2.5% (selon l'option utilisée). En supposant que l'incertitude sur ces estimations est proche de celle des expériences numériques, la quantité réelle de virus pouvant être aérosolisés dans les conditions de l'expérience serait comprise entre 1.2% et 5% du total de virus apportés. En ajoutant les biais induits par l'imperfection des Impingers, l'intervalle final serait compris entre 2.4 et 10%.

III.3.b.ii. *Aperçu général des résultats pour l'ensemble des expériences sous tunnel ventilé*

Les quantités de mengovirus murin initialement apportés au sol l'ont été, pour chaque expérience (i.e. pour chaque tunnel) par mélange de 3 doses de 35-40 mL chacune de suspension virale dont la description a été présentée en III.2.a.ii, 100 mL de la suspension obtenue étant complétée à 1 L par de l'eau pure ou de l'eau usée autoclavée. Pour chaque expérience sous tunnel, 3 à 4 dosages ont été effectués à 3 ou 4 dilutions avec un facteur 10 entre chaque dilution, afin de détecter un effet inhibiteur éventuel. En pratique, il n'y a aucune dépendance du dosage au facteur de dilution, notamment pour les expériences n°6 et n°7 pour lesquelles les virus ont été apportés avec de l'eau usée préalablement autoclavée et contenant divers composés pouvant potentiellement interférer avec les mesures en RT-qPCR (résultat non montré). De la même façon, il semble n'y avoir aucune dépendance du niveau initial de contamination au numéro de l'expérience sous tunnel (Figure III.13). Sous hypothèse d'une quantité de virus apportés identique pour toutes les expériences sous tunnel, l'apport initial a été estimé par la moyenne de toutes les données disponibles, soit $1.46 \cdot 10^{+10} \text{ gc.tunnel}^{-1}$.

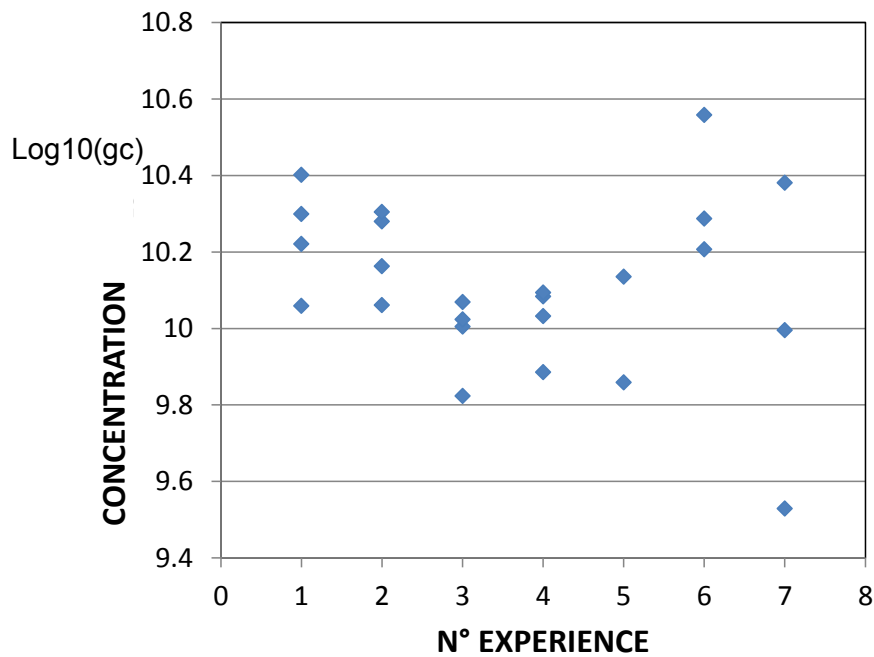


Figure III.13 : Mesures de la quantité de virus (gc) déposées pour chaque expérience sous tunnel.

Au cours des suivis d'aérosolisation des virus sous tunnels ventilés, les virus en suspension dans l'air ont été piégés parallèlement par les Impingers et par les filtres en polycarbonate. On dispose ainsi pour chaque intervalle de temps de 2 estimations des flux (estimés à partir des données brutes sans appliquer de facteur de correction comme celui proposé dans l'équation (III.5) pour les Impingers). On note que les estimations faites à partir des Impingers sont de l'ordre d'un \log_{10} plus élevées que celles faites à partir des filtres (Figure III.14).

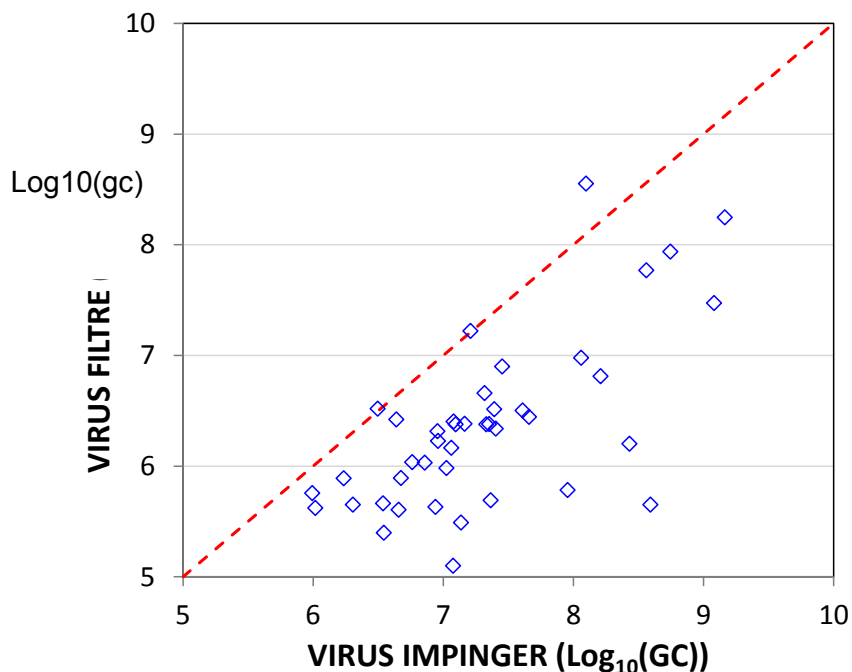


Figure III.14 : Comparaison des quantités de virus aérosolisés (gc) entre deux dates successives de changement d'Impinger et de filtre estimés à partir des virus piégés respectivement dans les Impingers et sur filtres.

Les flux calculés à partir des filtres dépendent simultanément du taux de piégeage des virus sur les filtres et du taux d'élution ultérieure des ARN viraux de ces virus avant quantification en RT-qPCR. Ces étapes peuvent toutes deux générer des biais. Sachant que les Impingers aboutissent déjà à sous-estimer l'aérosolisation si l'on n'applique pas de facteur de correction aux données brutes, l'utilisation des données issues des filtres ne peut aboutir qu'à des biais plus marqués.

L'ensemble des résultats des expériences sous tunnels (hormis ceux de l'expérience n°3 déjà décrits) sont présentés dans les Figures III.15 et III.16 dans les pages suivantes ; sur les mêmes figures ont été reportées les simulations faites avec l'option 1 (Figure III.15) et avec l'option 2 (Figure III.16). A première vue, les situations expérimentées sont bien contrastées. Environ 1/3 des virus aérosolisés le sont pendant la première demi-heure de suivi (Figure III.17) et ce, apparemment indépendamment des conditions expérimentales.

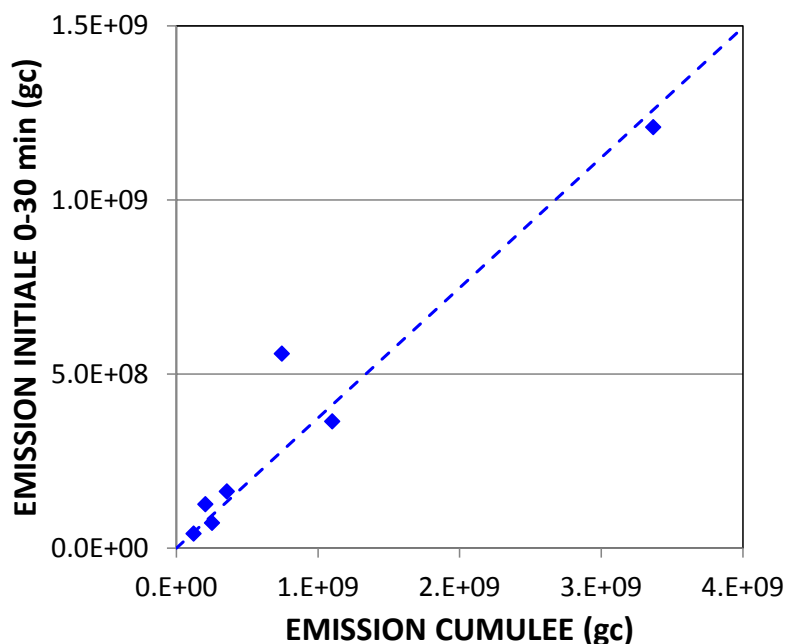


Figure III.17 : Corrélation entre quantité totale de virus aérosolisés (sur 54 à 56 h, sauf un suivi sur 24.5 h) et quantité de virus aérosolisés pendant les 30 premières minutes pour les expériences sous tunnels ventilés ($r^2=0.93$).

Les estimations de paramètres pour les options 1 et 2 permettent des ajustements des simulations proches des données expérimentales.

On note un bon accord entre la quantité cumulée de virus aérosolisés sur chacune des expériences et la quantité estimée $N_{v-m}(t=0)$ estimée par l'option 1 avec 2 paramètres ou avec la somme $N_{v-m}(t=0)+N_{v1}$ des paramètres $N_{v-m}(t=0)$ et N_{v1} estimés par l'option 1 avec 3 paramètres (Tableau III.7). On note par ailleurs un bon accord entre la quantité de virus aérosolisés au cours des 30 premières minutes et le paramètre N_{v1} estimés par l'option 1 avec 3 paramètres (Tableau III.7).

Si l'on observe pour les expériences 3 à 7 aussi un bon accord entre quantité estimée $N_{v-m}(t=0)$ estimée par l'option 1 avec 3 paramètres et l'option 2, il y a une forte divergence entre ces estimations pour les expériences 1 et 2 (Tableau III.7). Pour ces 2 premières expérimentations, il y a très probablement eu surestimation de quelques valeurs (contamination d'échantillons ? autre ? ...) (Figures III.15a et III.16a), et les valeurs estimées tout comme l'analyse préliminaire suggèrent d'accorder plus de confiance aux estimations issues de l'option 2, malgré la forte variabilité sur l'aérosolisation « instantanée » de virus (Figures III.15b et III.16b). Toutefois, sans estimation fiable de l'aérosolisation instantanée sur les 30 premières minutes de suivi, les valeurs de $N_{v-m}(t=0)$ et k_a estimées par l'option 2 restent insuffisantes pour pouvoir ensuite simuler les émissions pour ces 2 premières expériences.

Cette analyse est indirectement appuyée par la proximité des valeurs de k_a estimées respectivement par l'option 1 avec 3 paramètres et par l'option 2 (Tableau III.7). L'accord n'est pas parfait ; notamment les estimations divergent fortement entre options 1 et 2 pour les expériences 6 et 7, mais l'aérosolisation très rapide des virus pour ces 2 dernières expérimentations (Figures III.15e-f) amène à probablement beaucoup d'incertitude sur le partage entre aérosolisation instantanée et aérosolisation cinétique, donc sur les paramètres estimés pour les différentes méthodes mises en œuvre.

Tableau III.7 : Valeurs expérimentales cumulées sur 54 à 56 h en général, et aérosolisation initiale sur les 30 premières minutes ; paramètres ajustés

Exp. n°	Expérience		Modèle										
	Cum. exp. (10 ⁺⁸ gc)	Emis. (0-30 min) (10 ⁺⁸ gc)	Option 1 (2 paramètres)		Option 1 (3 paramètres)			Option 2 (2 paramètres ajustés, 1 calculé <i>a posteriori</i>)			Ajustement global (17 paramètres ajustés)		
			$N_{v-m}(t=0)$ (10 ⁺⁸ gc)	k_a (h ⁻¹)	$N_{v-m}(t=0)$ (10 ⁺⁸ gc)	k_a (h ⁻¹)	N_{v1} (10 ⁺⁸ gc)	$N_{v-m}(t=0)$ (10 ⁺⁸ gc)	k_a (h ⁻¹)	N_{v1}^{**} (10 ⁺⁸ gc)	$N_{v-m}(t=0)^{***}$ (10 ⁺⁸ gc)	k_a (h ⁻¹)	N_{v1} (10 ⁺⁸ gc)
1	34	12	34	0.0012	30	0.037	9.0	4.5	0.030	11.9	3.24	0.020	12.1
2	11	3.6	12	0.0014	10	0.059	2.1	0.49	0.054	3.62	0.356	0.018	3.63
3	3.6	1.6	3.3	0.29	2.0	0.076	1.6	1.8	0.064	1.47	1.88	0.065	1.56
4	1.2	0.41	1.0	0.13	1.6	0.012	0.45	1.1	0.027	0.31	2.64	0.007	0.399
5	2.5*	0.72	2.3	0.62	2.0	0.033	0.42	1.6	0.18	0.68	1.49	0.211	0.570
6	7.5	5.6	7.2	2.9	2.9	0.011	4.4	3.7	0.087	5.51	4.78	0.107	5.33
7	2.1	1.3	1.8	2.0	1.1	0.021	1.4	1.7	0.042	1.20	2.04	0.035	1.22

* : sur 24.5 h ; ** : estimé par différence entre la quantité de virus aérosolisée après 30 minutes et la quantité de virus aérosolisée de manière cinétique sur cet intervalle de temps ; *** : calculé à partir de l'équation $\hat{N}_{v-m}(t=0) = \left(8.89 \cdot 10^{+8} \times v_{wind}^2 \times \exp(-0.131 \times T)\right) + 1.74 \cdot 10^{+8} \times I_{ww}$

L'apport initial ayant été estimé à $1.46 \cdot 10^{+10}$ gc.tunnel⁻¹, le cumul expérimental des virus aérosolisés correspondrait sans utiliser de facteur de correction à 23, 7.5, 2.4, 0.8, 1.7, 5.1 et 1.4% de cet apport pour respectivement les expériences 1, 2, 3, 4, 5, 6 et 7. En tenant compte de l'incertitude liée notamment aux mesures de RT-qPCR et des biais liés à l'efficacité du piégeage des Impingers et à la ré-aérosolisation des virus piégés dans leur solution, on arriverait aux estimations sur la Figure III.18.

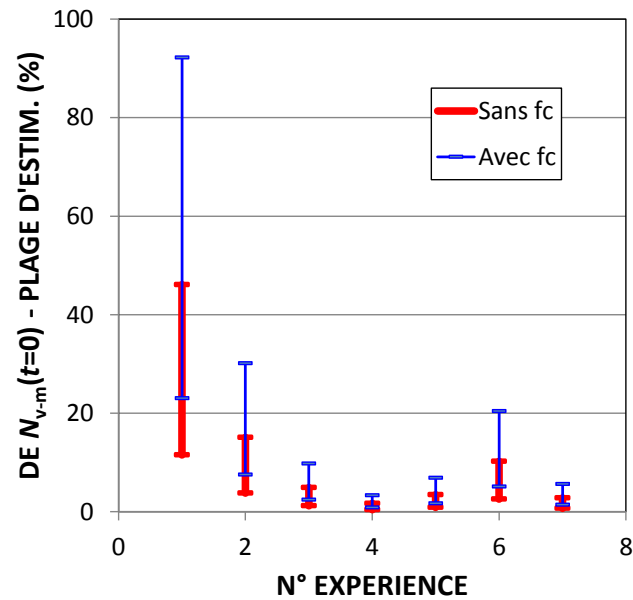


Figure III.18 : Plage d'estimation du cumul de virus aérosolisés sans ou après prise en compte du facteur de correction f_c (les résultats sont exprimés en % de l'apport initial).

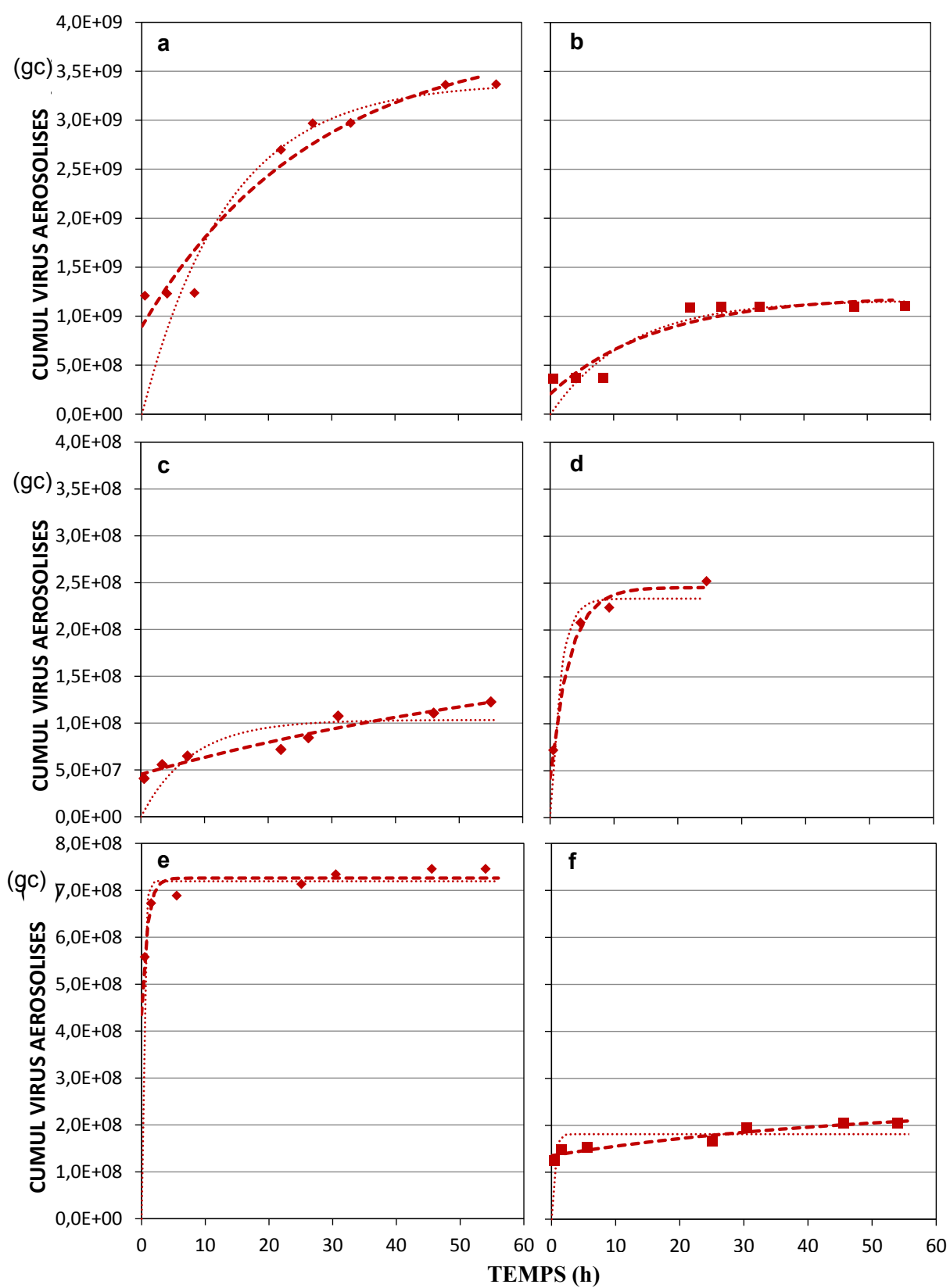


Figure III.15 : Quantités cumulées de virus aérosolisés au cours du temps pour les expériences 1 (a), 2 (b), 4 (c), 5 (d), 6 (e) et 7 (f). Les losanges représentent les mesures sous vent « fort » et les carrés sous vent faible.

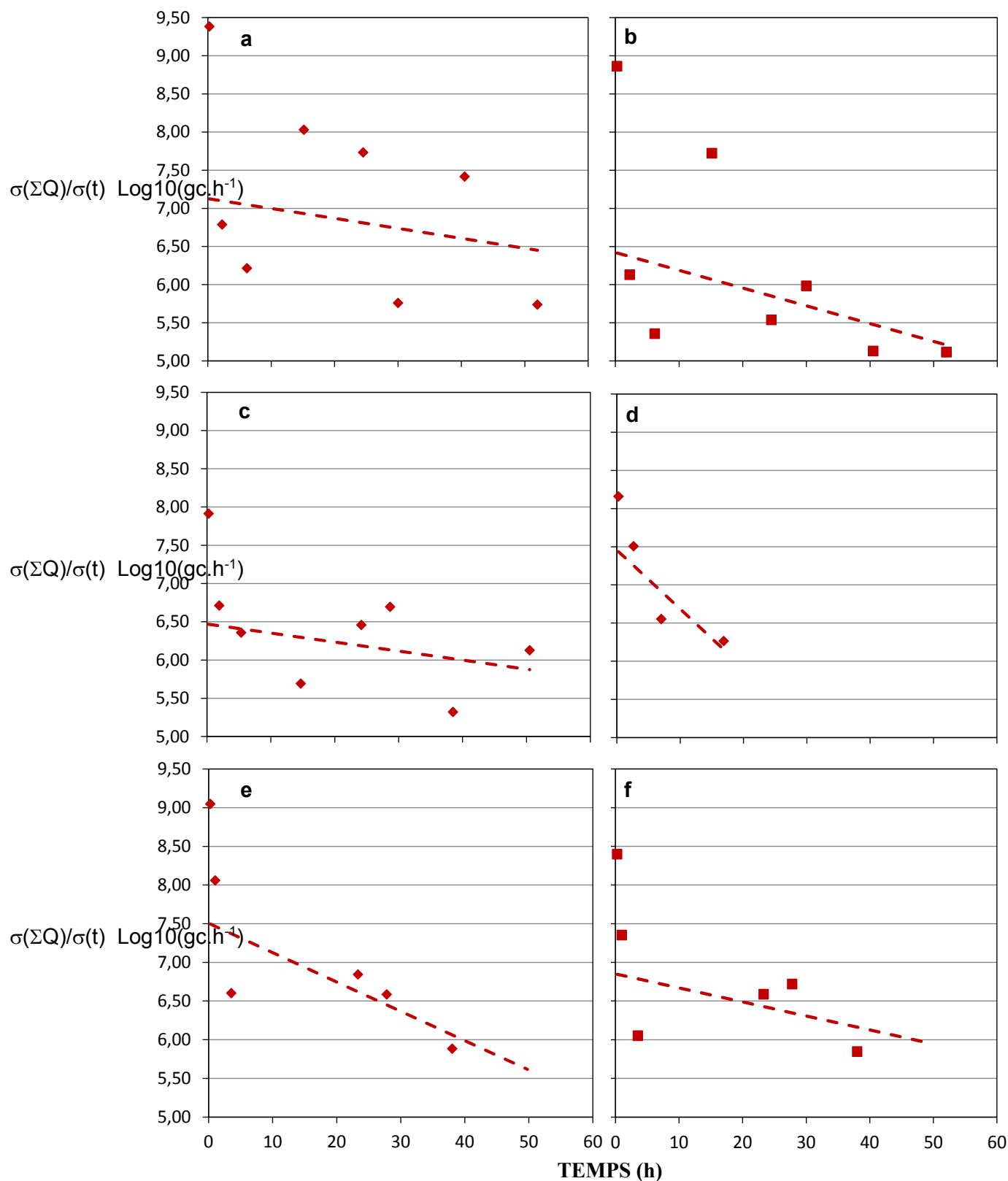


Figure III.16 : Flux instantané de virus aérosolisés au cours du temps pour les expériences 1 (a), 2 (b), 4 (c), 5 (d), 6 (e) et 7 (f). Les losanges représentent les mesures sous vent fort et les carrés sous vent faible.

III.3.b.iii. *Ebauche de modélisation*

Nous avons privilégié les paramètres N_{vi} , $N_{v-m}(t=0)$ et k_a estimés par l'option 2 (i.e. dont les estimations sont basées sur les flux « instantanés ») en raison de la qualité de cette option en termes de paramètres estimés.

Concernant $N_{v-m}(t=0)$, l'analyse des données expérimentales faisait apparaître une faible corrélation ($r=-0.70$; $P>0.90$) avec la température et une corrélation plus faible ($r=0.60$; $P>0.80$) avec la vitesse du vent, ces 2 dernières variables ne semblant pas corrélées entre elles ($r=-0.40$ avec 5 ddl). La corrélation positive entre la taille du pool de virus pouvant être aérosolisés sur un mode cinétique et la vitesse du vent semble facile à accepter (bien qu'elle ne soit pas forcément évidente avec la possibilité de déplacement des limites entre pools de virus aérosolisés instantanément et pool de virus aérosolisés sur un mode cinétique). La corrélation négative entre la taille du pool de virus pouvant être aérosolisés sur un mode cinétique et la température semble moins intuitive ; pourtant, elle peut tout à fait s'expliquer par l'effet de la température sur les forces hydrophile/hydrophobe (Syngouna et Chrysikopoulos, 2010). Ainsi, El Zanati (2011) avait montré que l'augmentation de température d'un sol de composition similaire et saturé en eau augmentait fortement l'immobilisation du même virus. La dépendance de $N_{v-m}(t=0)$ à chacune de ces variables nous a amené à tester des ajustements séparés pour chacune d'elles (Figures III.19a-b), puis à combiner de manière multiplicative les mêmes formalismes mathématiques pour tenir compte simultanément de ces 2 facteurs (Figure III.19c).

L'analyse des résidus non expliqués par ces derniers pris simultanément montre que les 2 valeurs fortement sous estimées correspondent aux expériences utilisant de l'eau usée ; aussi avons-nous intégré ce facteur sous forme de variable qualitative I_{ww} (égale à 0 et 1 pour respectivement de l'eau pure et de l'eau usée). En définitive nous obtenons l'équation suivante qui nous permet d'avoir un coefficient de corrélation de 0.98 entre la valeur de $N_{v-m}(t=0)$ issue de l'ajustement des données expérimentales par l'option 2 et la valeur de $N_{v-m}(t=0)$ prédite cette équation :

$$N_{v-m}(t=0) = \left(7.15 \cdot 10^{+6} \times v_{wind}^2 \times \exp(-0.123 \times T) \right) + 1.09 \cdot 10^{+8} \times I_{ww} \quad (III.19)$$

La qualité de l'ajustement peut paraître surprenante. L'équation (III.19) doit bien évidemment être considérée avec beaucoup de précautions et n'est certainement valable que pour notre contexte d'étude (sol, virus, eau, climat ...) et les situations envisagées.

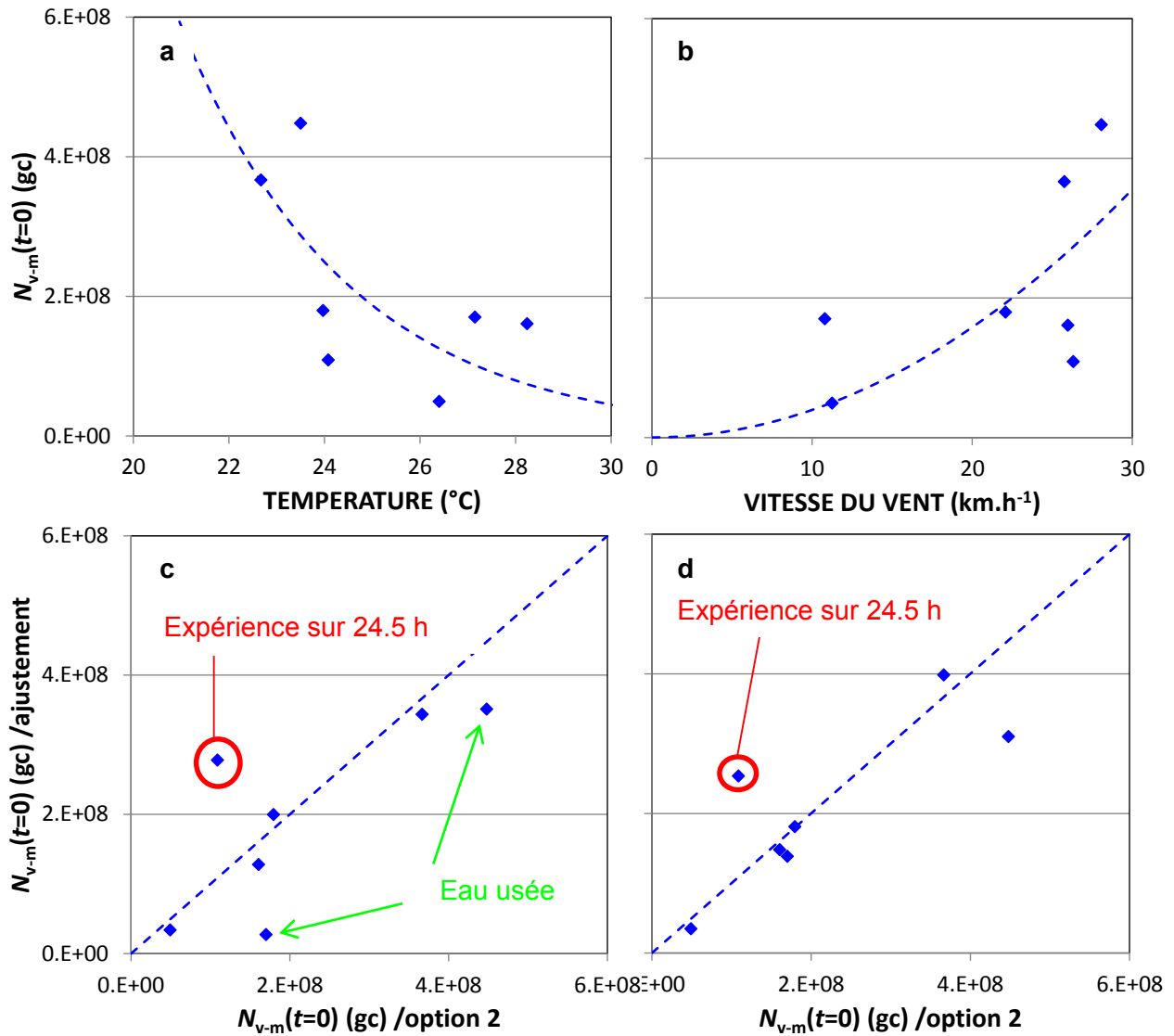


Figure III.19 : Ajustements divers en prévision d'un modèle décrivant $N_{v-m}(t=0)$ estimé par l'option 2 (taille du pool des virus aérosolisés de façon cinétique) : dépendance à la température de surface du sol avec pour relation ajustée $N_{v-m}(t=0) = 2.38 \cdot 10^{+11} \times \exp(-0.286 \times T)$ (a), dépendance à la vitesse du vent avec pour relation ajustée $N_{v-m}(t=0) = 3.95 \cdot 10^{+5} \times v_{wind}^2$ (b), qualité de l'ajustement prenant en compte simultanément la vitesse du vent et la température de surface du sol avec pour relation ajustée $N_{v-m}(t=0) = 3.12 \cdot 10^{+7} \times v_{wind}^2 \times \exp(-0.181 \times T)$ (c), et qualité de l'ajustement prenant en compte simultanément la vitesse du vent, la température de surface du sol et la nature de l'eau contaminée (d).

En contraste, nous n'avons pas pu établir de relation simple entre les estimations des émissions instantanées (N_{v1}) et les variables considérées, très probablement parce que chacune des estimations est entachée d'un aléa important (cf. section III.3.a.ii. et Figure III.6a). On peut toujours utiliser une relation de proportionnalité entre l'aérosolisation « instantanée » N_{v1} et l'aérosolisation cinétique $N_{v-m}(t=0)$ comme le suggère la Figure III.17.

De la même façon, il ne semble pas y avoir de relation évidente entre k_a (appliqué au pool de virus aérosolisés sur un mode cinétique). Toutefois, toutes les valeurs estimées par l'option 2 de k_a sont comprises entre 0.027 et 0.087 h⁻¹, à l'exception d'une seule (0.18 h⁻¹) correspondant à l'expérience n°5 correspondant à un suivi réduit à 24.5 h en contraste avec les autres suivis ayant tous dépassé 50 h. On peut raisonnablement penser que la durée du suivi affecte aussi les paramètres estimés. Pour tous les autres suivis, il paraîtrait envisageable en première approche d'utiliser une valeur moyenne de k_a – hors valeur forte pour l'expérience n°5 – (≈ 0.051 h⁻¹).

En substituant l'équation III.19 par l'équation III.14 faisant intervenir 3 coefficients a, b, c nous avons ajusté les simulations telles que définies par l'équation III.11 aux données expérimentales ; nous avons ainsi estimé ces 3 coefficients a, b, c, les 7 quantités de virus aérosolisés quasi-instantanément $N_{vi}(j)$, et les 7 coefficients cinétiques $k_a(j)$, j étant le numéro de l'expérience et variant de 1 à 7. Les logarithmes népériens des quantités de virus aérosolisés sur chaque intervalle de temps correspondant à l'utilisation d'un Impinger ont été comparés aux logarithmes des mêmes valeurs simulées (Figure III.20). Un premier ajustement utilisant la totalité des données a abouti à un écart-type résiduel de 1.50 sur les logarithmes népériens, soit 0.65 sur les logarithmes décimaux (résultats non montrés). Trois valeurs correspondant à des points "excentrés" et correspondant pour 2 d'entre eux à des accumulations anormalement élevées de virus ont été écartées dans un 2^{ème} temps de l'ajustement (cf. points entourés en rouge dans la Figure III.20), réduisant ainsi l'écart type résiduel à 1.25 sur les logarithmes népériens, soit 0.54 sur les logarithmes décimaux.

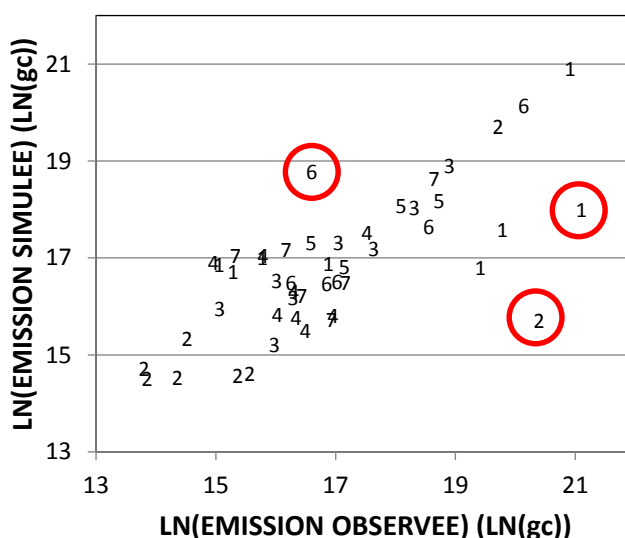


Figure III.20 : Relation entre logarithmes népériens des émissions observées et des émissions simulées sur les intervalles de temps correspondant à l'utilisation d'un même Impinger pour chacune des 7 expériences. Les 3 points entourés d'un cercle rouge correspondent à des valeurs utilisées pour un 1^{er} ajustement (écart-type résiduel sur les logarithmes népériens alors égal à 1.5) et éliminés dans un 2^{ème} ajustement (écart-type résiduel sur les logarithmes népériens alors égal à 1.25).

Les valeurs de a, b et c aboutissent à une équation pour $N_{v-m}(t=0)$ peu différente de l'équation (III.19) :

$$\hat{N}_{v-m}(t=0) = \left(8.89 \cdot 10^{+8} \times v_{wind}^2 \times \exp(-0.131 \times T) \right) + 1.74 \cdot 10^{+8} \times I_{ww} \quad (III.20)$$

Les autres valeurs ajustées ($N_{v1}(i)$ et $k_a(i)$ pour i variant de 1 à 7) sont présentées dans le tableau III.7 ; nous y avons joint les estimations de $N_{v-m}(t=0)$ calculées par l'équation (III.20). Globalement, les estimations obtenues par les différentes méthodes semblent cohérentes, avec toutefois certaines estimations variant fortement avec la méthode.

Un résultat très intéressant est certainement encore la très bonne capacité du modèle à simuler les données expérimentales dans toutes les expériences (Figure III.21), si l'on admet que pour les 2 premières le décalage entre valeurs observées et valeurs calculées au-delà de 20 h correspond à des accumulations de virus peu vraisemblables dans les Impingers entre un peu plus de 8 h et 23 h.

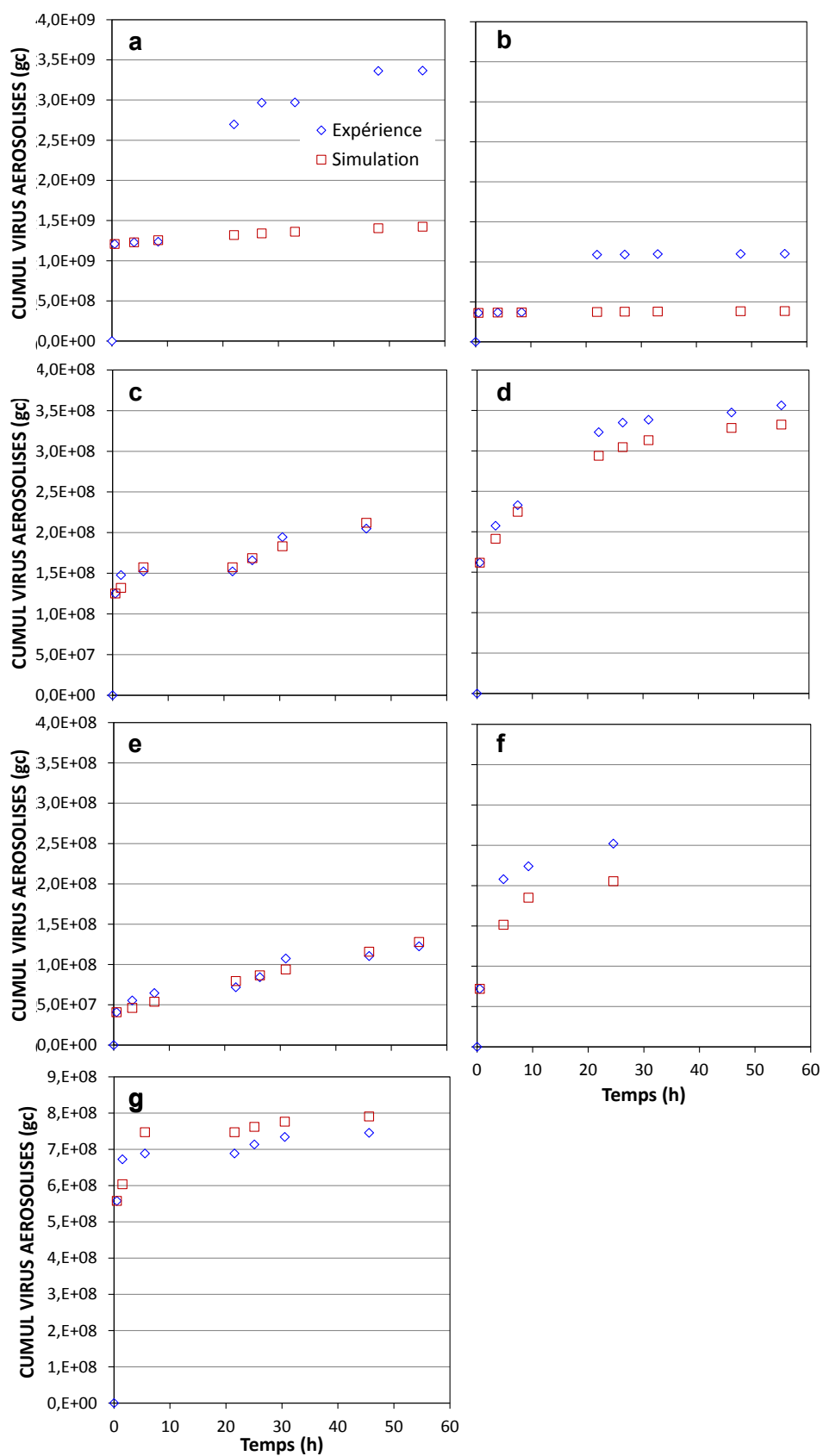


Figure III.21 : Quantités cumulées observées et simulées de virus aérosolisés au cours du temps pour les expériences 1 (a), 2 (b), 7 (c), 3 (d), 4 (e), 5 (f) et 6 (g). Les quantités simulées résultent de l'ajustement global des 17 paramètres.

III.4. Conclusion

Ce travail avait comme objectif d'évaluer la possibilité de remise en suspension dans l'atmosphère de virus préalablement apportés au sol par irrigation en se focalisant sur la quantité totale de virus pouvant être remis en suspension et sur la vitesse à laquelle ce phénomène se produit. Ce travail a nécessité d'adapter au préalable la méthode des 'tunnels ventilés' (Lockyer, 1984 ; Loubet et al., 1999a et 1999b ; Bedos et al., 2002), d'évaluer dans nos conditions expérimentales les performances de bio-collecteurs (West et Kimber, 2015 ; Verreault et al., 2008) utilisés pour piéger les virus en suspension dans l'air, et en définitive d'évaluer la précision des estimations relatives aux aspects 'quantité' et 'vitesse' au vu des incertitudes et des biais sur les mesures de teneurs en virus en suspension dans l'air. Pour analyser les résultats obtenus, nous avons considéré que les virus aérosolisables à partir du sol appartenaient à un ou plusieurs pools caractérisés par leur taille et leur coefficient cinétique d'aérosolisation. Notre travail est à notre connaissance la première étude relative à l'aérosolisation de virus entériques déposés au sol avec l'irrigation par des eaux usées insuffisamment traitées.

Au niveau méthodologique, nous avons comparé, pour un pool unique de virus, différentes méthodes d'évaluation des paramètres 'taille' et 'vitesse d'aérosolisation' du pool et évalué l'incertitude sur leur estimation. Ce travail a été réalisé à partir de 100 expériences numériques correspondant à une même réalité expérimentale, chaque réalisation numérique étant entachée d'aléas en accord avec les incertitudes sur les mesures de nombre de copies de génomes viraux par RT-qPCR. Nous avons montré que les paramètres caractérisant le pool de virus aérosolisables sont estimés de façon plus précise à partir de l'aérosolisation "instantanée" (option 2) qu'à partir de l'accumulation de virus aérosolisés dans le temps (option 1) à différentes dates. Le contraste entre ces 2 approches peut s'expliquer par le fait qu'un écart à une date donnée entre valeur théorique et valeur déduite d'une ou plusieurs mesures en RT-qPCR se propage sur l'ensemble des valeurs cumulées de virus aérosolisés aux dates ultérieures ; à l'inverse, cet écart ne se propage pas aux données ultérieures lorsqu'on analyse l'aérosolisation instantanée, la méthode permettant alors plus ou moins facilement de détecter une valeur aberrante. Avec nos protocoles expérimentaux et en absence de biais sur les données expérimentales, la taille réelle du pool de virus aérosolisés $N_{v-m}(t=0)$ (gc) est comprise entre plus de la moitié et moins de 2 fois la valeur estimée ; de la même façon, le coefficient cinétique d'aérosolisation réel k_a est comprise entre 0.7 et 1.4 fois sa valeur estimée. Malheureusement, les Impingers AGI-4 que nous avons utilisés (comme hélas tous les autres biocollecteurs) ajoutent des biais aux incertitudes précédemment évoquées : les biais résultent d'une efficacité de piégeage des virus inférieure à 1 et d'une ré-aérosolisation partielle des virus préalablement piégés (Dart et Thornburg, 2008 ; Li et al., 1997). Nos données pour qualifier les Impingers sont imprécises : nous avons estimé grossièrement que 77% des virus traversant la solution de piégeage d'un Impinger étaient piégés dans ce dernier et que 11% des virus préalablement piégés étaient ré-aérosolisés pour 1 h de barbotage d'air avec un débit d'environ 4 L.min⁻¹. En se basant sur ces valeurs, nous avons décrit l'évolution de la concentration en virus piégés dans un Impinger au cours du temps pour un flux d'air ayant une charge constante en virus. Rapportée à l'évolution de la concentration en virus en situation de piégeage total, nous avons ainsi défini un facteur de correction, fonction de la durée d'accumulation des virus dans l'Impinger, nous permettant de corriger les données expérimentales. L'ajustement pratiqué sur les données ainsi corrigées amène à une valeur de $N_{v-m}(t=0)$ égale à environ 2 fois sa valeur estimée sans cette correction ; elle amène à peu de changement sur la valeur estimée de k_a . En tenant compte simultanément des incertitudes et des biais, la valeur réelle de $N_{v-m}(t=0)$ serait alors comprise entre sa valeur estimée et 4 fois sa valeur estimée. Au-delà, l'utilisation d'expériences numériques s'avère être un outil potentiellement puissant pour

affiner les protocoles expérimentaux (date de changement des biocollecteurs, nombre de réplicats dans les mesures de RT-QPCR ...). Potentiellement, une des limites à ce type d'approche est l'existence de plusieurs pools ayant chacun leurs paramètres ($N_{v-m}(t=0)$ et k_a). L'expérience semble nous dire que la distinction de 2 pools semble suffisante : un pool aérosolisé "instantanément" et un pool aérosolisé sur un mode cinétique. Toutefois, cette hypothèse méritera d'être reprise dans des travaux ultérieurs.

Les expériences sous tunnels ventilés montrent qu'entre 0.8 et 23% des virus apportés peuvent être remobilisés en se basant uniquement sur les quantités cumulées de virus aérosolisés. Environ 1/3 des virus aérosolisés le sont pendant les 30 premières minutes des suivis. On distingue un pool de virus aérosolisés quasi-instantanément et dont la taille ajustée correspond approximativement aux virus aérosolisés durant les 30 premières minutes des suivis. Si l'on s'intéresse aux virus aérosolisés sur un mode cinétique, leur nombre $N_{v-m}(t=0)$ (en gc) semble pouvoir être très bien estimé en tenant compte de la vitesse du vent (fonction carrée), de la température (fonction exponentielle décrivant probablement l'effet de la température sur les forces de type hydrophile/hydrophobe) et de la nature de l'eau, l'eau usée réduisant l'adsorption des virus à la surface des solides (compétition entre MO des eaux usées et virus pour cette adsorption). Les coefficients cinétiques d'aérosolisation k_a pour ce pool cinétique varient entre 0.007 (correspondant à 13 j pour aérosoliser 90% des virus aérosolisables) et 0.21 (correspondant à 11 h pour aérosoliser 90% des virus aérosolisables), en exceptant l'expérience courte (n°5 sur 24.5 h), d'un ou plusieurs pools de virus mobilisés plus progressivement. L'ajustement simultané des simulations aux données des 7 expériences sous tunnel, en décrivant $N_{v-m}(t=0)$ par le même formalisme mathématique faisant intervenir 3 paramètres, permet de refléter alors très bien les 7 expériences et de mieux mettre en évidence quelques données aberrantes dans les deux premières expériences. En utilisant cet ajustement, les émissions sont comprises entre 1 % et 10 % sans tenir compte du facteur de correction f_c égal à 2 environ.

Ce travail pourrait être amélioré, complété et poursuivi en s'attelant à différentes facettes du problème :

- l'amélioration méthodes : (i) Impinger (revisite des coefficients. voire optimisation géométrie de l'impinger, composition de la solution de piègeage, débit de la pompe...) ou autre bio-collecteur plus performant, (ii) Plan d'échantillonnage (fréquence des mesures, nombre de répétitions, durée de suivi) ... ;
- l'acquisition d'un grand nombre de résultats pour avoir un modèle ayant une valeur générique d'abord sur un sol donné, éventuellement progressivement en jouant sur plusieurs sols ;
- L'amélioration de la compréhension des processus en revisitant les pools à définir/retenir en fonction de leur spéciation dans l'air (virus isolés, virus adsorbés à la surface de colloïdes inerts eux-mêmes aérosolisés et éventuellement distinction de pools suivant la nature de ces colloïdes ...), voire en fonction de leur spéciation en surface du sol. Ce dernier point suppose de pouvoir « extraire » par des méthodes douces les virus à la surface du sol.

Références:

- Asano T. 1998. Wastewater reclamation and reuse. *Water Quality Management Series* Volume 10, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Barron, A.L., Olshevsky C., et Cohen M.M.. 1970. Characteristics of the BGM line of cells from African green monkey kidney . *Arch. Für Gesamte Virusforsch.* Vol. 32, n°4, p. 389-392.
- Bates B.C., Kundzewicz Z.W., Wu S., Palutikof J.P. 2008. Climate Change and Water. *Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC Secretariat, Geneva, 210 pp.
- Bedos C., Rousseau-Djabri M.F., Flura D., Masson S., Barriuso E., Cellier, P. 2002. Rate of pesticide volatilization from soil: an experimental approach with a wind tunnel system applied to trifluralin. *Atmospheric Environment* 36, 5917-5925.
- Bixio D., Thoeve C., De Koning J., Joksimovic D., Savic D., Wintgens T., Melin T. 2006. Wastewater reuse in Europe. *Desalination* 187, 89-101.
- Bixio D., Thoeve C., Wintgens T., Ravazzini A., Miska V., Muston M., Chikurel H., Aharoni A., Joksimovic D., Melin T. 2008. Water reclamation and reuse: implementation and management issues. *Desalination* 218, 13-23.
- Blatny J.M., Reif B.A.P., Skogan G., Andreassen O., Høiby E.A., Ask E., Waagen V., Aanonsen D., Aaberge I.S., et Caugant D.A.. 2008. Tracking airborne Legionella and Legionella pneumophila at a biological treatment plant . *Environ. Sci. Technol.* Vol. 42, n°19, p. 7360-7367.
- Brooks J. P., Tanner B.D., Gerba C.P., Haas C.N., et Pepper I. L. 2005. Estimation of bioaerosol risk of infection to residents adjacent to a land applied biosolids site using an empirically derived transport model. *Journal of applied microbiology*, 98(2), 397-405.
- Burton N.C., Grinshpun S.A., et Reponen T. 2007. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Annals of Occupational Hygiene*, 51(2), 143-151.
- Cao H., Tsai F.T.C., et Rusch, K. A. 2010. Salinity and soluble organic matter on virus sorption in sand and soil columns. *Groundwater*, 48(1), 42-52.
- CAC/GL 79-2012. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food. Codex alimentarius. International Food Standards.
- Carducci A., Arrighi S., Ruschi A. 1995. Detection of coliphages and enteroviruses in sewage and aerosol from an activated sludge wastewater treatment plant. *Letters in Applied Microbiology* 21, 207-209.
- Carducci A., Battistini R., Rovini E., et Verani M. 2009. Viral removal by wastewater treatment: monitoring of indicators and pathogens. *Food and Environmental Virology*, 1(2), 85-91.
- Chancellor D.D., Tyagi S., Bazaco M.C., Bacvinskas S., Chancellor M.B., Dato V.M., de Miguel F. 2006. Green onions: potential mechanism for hepatitis A contamination. *Journal of Food Protection* 69, 1468-1472.
- Cook N., et D'Agostino M. 2013. Prevalence and control of hepatitis A virus in fresh produce. *Food Borne Viruses and Prions and Their Significance for Public Health*, 169.
- Costafreda M.I., Bosch A., Pintó R.M. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 804-810.
- Craun G.F., Brunkard J.M., Yoder J.S., Roberts V.A., Carpenter J., Wade T., Calderon R.L., Roberts J.M., Beach M.J., Roy S.L. 2010. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 507-528.
- Dart A., Thornburg J. 2008. Collection efficiencies of bioaerosol impingers for virus-containing aerosols. *Atmospheric Environment* 42, 828-832.
- Da Silva A.R., Kavanagh O.V., Estes M.K., Elimelech M. 2011. Adsorption and aggregation properties of Norovirus GI and GII virus-like particles demonstrate differing responses to solution chemistry. *Environmental Science & Technology* 45, 520-526.
- DiCaprio E., Culbertson D., Li J. 2015. Evidence of the internalization of animal caliciviruses via the root of growing strawberry plants and dissemination to the fruit. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-03867.

- DiCaprio E., Ma Y., Purgianto A., Hughes J., Li J. 2012. Internalization and dissemination of human norovirus and animal caliciviruses in hydroponically grown romaine lettuce. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 6143-6152.
- Dungan R.S. 2014. Estimation of infectious risks in residential populations exposed to airborne pathogens during center pivot irrigation of dairy wastewaters. *Environmental Science & Technology* 48, 5033-504
- El Zanati O. 2011. Rétention et restitution d'un Mengovirus murin, utilisé comme substitut du virus de l'hépatite A, dans un modèle de colonne de sol en fonction de la granulométrie des agrégats et propriétés physicochimiques de la solution circulante. *Mémoire de Master 2, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse*.
- Ensink J.H.J., van der Hoek W. 2006. Raw wastewater use in agriculture; risk versus benefits. In *Health Impact Assessment for Sustainable Water Management Edited by Lorna Fewtrell and David Kay*. Published by IWA Publishing, London, UK, Chapter 10, pp. 233-248.
- Fracchia L., Pietronave S., Rinaldi M., Martinotti M.G. 2006. Site-related airborne biological hazard and seasonal variations in two wastewater treatment plants. *Water Research* 40, 1985-1994.
- Giungato P., Nardone E., Notarnicola L. 2010. Reclamation of treated wastewater in the Apulia región (Italy): state of the art and future perspectives. *J. Commodity Sci. Technol. Quality* 49, 105-120.
- Goldstein R.E.R., Micallef S.A., Gibbs S.G., He X., George A., Sapkota A., Joseph S.W., Sapkota A.R. 2014. Occupational exposure to *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. among spray irrigation workers using reclaimed water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11, 4340-4355.
- Grinshpun S.A., Willeke K., Ulevicius V., Juozaitis A., Terzieva S., Donnelly J., Stelma G.N., Brenner K.P. 1997. Effect of Impaction, Bounce and Reaerosolization on the Collection Efficiency of Impingers. *Aerosol Science and Technology* 26, 326-42.
- Han T., Mainelis G. 2012. Investigation of inherent and latent internal losses in liquid-based bioaerosol samplers. *Journal of Aerosol Science* 45, 58-68.
- Harstad J. B. 1965. Sampling submicron T1 bacteriophage aerosols. *Applied microbiology*, 13(6), 899-908.
- Henningson E.W., Ahlberg M.S. 1994. Evaluation of Microbiological Aerosol Samplers: A Review. *Journal of Aerosol Science* 25, 1459-92. doi:10.1016/0021-8502(94)90219-4.
- Hermann J.R., Hoff S.J., Yoon K.J., Burkhardt A.C., Evans R.B., Zimmerman J.J. 2006. Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4811-4818.
- Hirneisen K.A., Kniel K.E. 2013. Comparative uptake of enteric viruses into spinach and green onions. *Food and Environmental Virology* 5, 24-34.
- Hogan C.J., Kettleson E.M., Lee M.H., Ramaswami B., Angenent L.T., Biswas P. 2005. Sampling methodologies and dosage assessment techniques for submicrometre and ultrafine virus aerosol particles. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1422-1434.
- Jiménez B., Drechsel P., Koné D., Bahri A., Raschid-Sally L., Qadir M. 2010. Wastewater, sludge and excreta use in developing countries: an overview. In: *Wastewater Irrigation and Health Assessing and Mitigating Risk in Low-Income Countries* (Drechsel P., Scott C.A., Raschid-Sally L., Redwood M., Bahri A. eds.), 3-27.
- Jones A. M., et Harrison, R.M. 2004. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations—a review. *Science of the Total Environment*, 326(1), 151-180.
- Kennedy C., Baker L., Dhakal S., Ramaswami A. 2012. Sustainable urban systems: an integrated approach. *Journal of Industrial Ecology* 16, 775-779.
- Keraita B., Jiménez B., Drechsel P. 2008. Extent and implications of agricultural reuse of untreated, partly treated and diluted wastewater in developing countries. *CAB reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources* 3, 1-15.
- Koopmans M., Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology* 90, 23-41.

- La Rosa G., Pourshaban M., Iaconelli M., Muscillo M. 2010. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali del l'Istituto superiore di sanità* 46, 266-273.
- Layshock J.A., Pearson B., Crockett K., Brown M.J., Van Cuyk S., Daniel W.B., Omberg K.M. 2012. Reaerosolization of *Bacillus* spp. in outdoor environments: a review of the experimental literature. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science* 10, 299-303.
- Li C.S. 1999. Evaluation of microbial samplers for bacterial microorganisms. *Aerosol Science & Technology*, 30(2), 100-108.
- Lin X., Willeke K., Ulevicius V., et Grinshpun S. A. 1997. Effect of sampling time on the collection efficiency of all-glass impingers. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 58(7), 480-488.
- Liu K., Wen Z., Li N., Yang W., Wang J., Hu L., Dong X., Lu J., Li J. 2012. Impact of Relative Humidity and Collection Media on Mycobacteriophage D29 Aerosol. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1466-72. doi:10.1128/AEM.06610-11.
- Lockyer D.R. 1984. A system for the measurement in the field of losses of ammonia through volatilization. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35, 837-848.
- Loubet B., Cellier P., Flura D., Genermont S. 1999a. An evaluation of the wind-tunnel technique for estimating ammonia volatilization from land: Part 1. Analysis and improvement of accuracy. *Journal of Agricultural Engineering Research* 72, 71-81.
- Loubet B., Cellier P., Genermont S., Flura D. 1999b. An evaluation of the wind-tunnel technique for estimating ammonia volatilization from land: Part 2. Influence of the tunnel on transfer processes. *Journal of Agricultural Engineering Research* 72, 83-92.
- Mara D.D., Sleigh P.A., Blumenthal U.J., Carr R.M. 2007. 'Health risks in wastewater irrigation: Comparing estimates from quantitative microbial risk analyses and epidemiological studies', *Journal of Water and Health* 5, 39-50.
- Marks P.J., Vipond I.B., Carlisle D., Deakin D., Fey R.E., Caul E.O. 2000. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiology and Infection* 124, 481-487.
- Marks P.J., Vipond I.B., Regan F.M., Wedgwood K., Fey R.E., Caul E.O. 2003. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiology and Infection* 131, 727-736.
- Martin L.R., Duke G.M., Osorio J.E., Hall D.J., et Palmenberg A.C. 1996. Mutational analysis of the mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences. *J. Virol.* Vol. 70, n°3, p. 2027-2031.
- Masclaux F.G., Hotz P., Gashi D., Savova-Bianchi D., Oppliger A. 2014. Assessment of airborne virus contamination in wastewater treatment plants. *Environmental Research* 133, 260-265.
- Morris C. E., Leyronas C., et Nicot P.C. 2014. Movement of Bioaerosols in the Atmosphere and the Consequences for Climate and Microbial Evolution. *Aerosol Science: Technology and Applications*, 393-415.
- Nazaroff W.W. 2011. Norovirus, gastroenteritis, and indoor environmental quality. *Indoor Air* 21, 353-356.
- Nenonen N.P., Hannoun C., Svensson L., Torén K., Andersson L.M., Westin J., Bergström T. 2014. Norovirus GII. 4 detection in environmental samples from patient rooms during nosocomial outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 2352-2358.
- Pachepsky Y., Shelton D.R., McLain J.E.T., Patel J., Mandrell R.E. 2011. Irrigation as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. *Advances in Agronomy* 113 (Chapter two), 73-138.
- Petrinca A.R., Donia D., Pierangeli A., Gabrieli R., Degener A.M., Bonanni E., Diaco L., Cecchini G., Anastasi P., Divizia M. 2009. Presence and environmental circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1608-1617.
- Pinto R.M., Costafreda M.I., et Bosch A.. 2009. Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A . *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 75, n°23, p. 7350-7355.
- Pusch D., Oh D.Y., Wolf S., Dumke R., Schröter-Bobsin U., Höhne M., Schreier E. 2005. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of virology* 150, 929-947.
- Qadir M., Bahri A., Sato T., et Al-Karadsheh E. 2010. Wastewater production, treatment, and irrigation in Middle East and North Africa . *Irrig. Drain. Syst.* Vol. 24, n°1, p. 37-51.

- Raschid-Sally L., Jayakody P. 2008. Drivers and characteristics of wastewater agriculture in developing countries: results from a global assessment. International *Water Management Institute (IWMI)*, Research Report 127.
- Reynolds K.A., Mena K.D, et Gerba C.P. 2008. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States. *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 192, p. 117–158.
- Rodríguez-Lázaro D, Cook N., Ruggeri F.M, Sellwood J., Nasser A., Nascimento M.S.J, D’Agostino M., Santos R., Saiz J.C, Rzeżutka A., Bosch A., Gironés R., Carducci A., Muscillo M., Kovač K., Diez-Valcarce M., Vantarakis A., Bonsdorff C-H., Roda Husman A.M., Hernández M., Poel W.H.M. 2012. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiology Reviews* 36:786–814.
- Sano D., Ohta T., Nakamura A., Nakagomi T., Nakagomi O., et Okabe S. 2015. Culture-Independent Evaluation of Nonenveloped-Virus Infectivity Reduced by Free-Chlorine Disinfection. *Applied and environmental microbiology*, 81(8), 2819-2826.
- Syngouna V.I., Chrysikopoulos C.V. 2010. Interaction between viruses and clays in static and dynamic batch systems. *Environmental Science and Technology* 44, 4539-4544.
- Taylor R.G. et al. 2012. Ground water and climate change. *Nature Climate Change*, published online.
- Tseng C.C., Li C.S. 2005. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *Journal of Aerosol Science* 36, 593-607.
- Van den Berg H., Lodder W., van der Poel W., Vennema H., de Roda Husman A.M. 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Research in Microbiology* 156, 532-540.
- Van der Bruggen B. 2010. The global water recycling situation. *Sustainability Science and Engineering*, 2, 41-62.
- Verreault D., Moineau S., Duchaine C. 2008. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72, 413-444.
- Wei J., Jin Y., Sims T., et Kniel K. E. 2010. Manure-and biosolids-resident murine norovirus 1 attachment to and internalization by Romaine lettuce. *Applied and environmental microbiology*, 76(2), 578-583.
- Wei J., Jin Y., Sims T., Kniel K.E. 2011. Internalization of murine norovirus 1 by *Lactuca sativa* during irrigation. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2508-2512.
- West J.S., Kimber R.B.E. 2015. Innovations in air sampling to detect plant pathogens. *Annals of Applied Biology* 166, 4-17.
- WHO 2006. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Geneva : WHO (World Health Organization).
- Zhuang J., et Jin Y. 2008. Interactions between viruses and goethite during saturated flow: Effects of solution pH, carbonate, and phosphate. *Journal of contaminant hydrology*, 98(1), 15-21.
- Ziros P.G., Kokkinos P.A., Legaki E., Vantarakis A. 2011. Development of an optimized method for the detection of airborne viruses with real-time PCR analysis. *Virology Journal* 8, 369-375.

Chapitre IV) Inactivation dans l'atmosphère des virus mise au point d'un nouveau réacteur et application au mengovirus murin

Ce chapitre donnera peut-être lieu à la publication d'une short-note :

Girardin G. et al. 2015. Inactivation of murine mengovirus and some human enteric viruses exposed to various atmospheric conditions.

IV.1.	INTRODUCTION	91
IV.2.	MATERIELS ET METHODES	95
IV.2.a.	<i>Le virus</i>	95
IV.2.b.	<i>Protocoles expérimentaux et plan d'expérience</i>	96
IV.2.b.i.	Le dispositif d'étude	96
IV.2.b.ii.	Protocole expérimental	98
IV.2.b.iii.	Plan d'expérience	99
IV.2.c.	<i>Modélisation des processus ; traitement des données expérimentales</i>	99
IV.2.d.	<i>Analyse de jeu de données expérimentales de la littérature :</i>	102
IV.3.	RESULTATS ET DISCUSSIONS	103
IV.3.a.	<i>Niveau initial d'inoculation des tubes ; tests d'homogénéité entre expériences</i>	103
IV.3.b.	<i>Evaluation du maintien des nombres de copies génomiques d'ARN viral</i>	104
IV.3.c.	<i>Inactivation des virus</i>	104
IV.3.d.	<i>Analyse des nombres de copies génomiques d'ARN viral</i>	109
IV.4.	CONCLUSION	111

Résumé

Réutiliser les eaux usées en irrigation agricole aide à répondre aux besoins croissants d'eau, réduit leur décharge dans les eaux conventionnelles et participe à la fertilisation des sols. Les eaux usées d'origine domestique contiennent des virus entériques de l'homme responsables d'épidémies transmises par voies hydrique et alimentaire. Leur transmission aérienne avec maladie à la clé existe, et il a été montré récemment que des virus apportés au sol par irrigation pouvaient être aérosolisés. Plusieurs études ont traité de l'inactivation de virus soumis à diverses conditions atmosphériques, mais les résultats restent trop rares, spécifiques à chaque virus, et parfois difficiles à exploiter. Ce travail visait à évaluer l'inactivation du mengovirus murin soumis à diverses conditions atmosphériques, ainsi qu'à analyser quelques cinétiques d'inactivation accessibles dans la littérature. Nous avons conçu un réacteur atmosphérique permettant de contrôler la température et l'humidité relative de l'air, voire d'imposer une teneur en O₃ entrante et un rayonnement. Après comparaison de différents supports, des suivis expérimentaux ont été réalisés pour des mengovirus murins déposés au fond de tubes en polypropylène et exposés à diverses conditions de températures (15, 25 et 40°C), d'humidité relative (30, 50, 65 et 80 %), d'O₃ entrant (sans ou 300 ppb) et de rayonnement (sans ou avec). Pour chaque suivi, des tubes étaient prélevés à différentes dates et les virus remis en suspension dans un tampon de PBS pour dénombrement ultérieur des virus infectieux par comptage de plages de lyse et de leur ARN en RT-qPCR. Un modèle de dépendance du coefficient d'inactivation à l'humidité relative de l'air a été proposé et a permis une première analyse des données à 25°C sans rayonnement et sans O₃. Travailler sur des supports en polypropylène a permis de récupérer ultérieurement tous les virus, pour des incubations sans rayonnement ni O₃. A 25°C, l'inactivation est d'autant plus rapide que l'humidité relative de l'air est faible. A cette température, l'estimation du coefficient d'inactivation en fonction de l'humidité relative permet de refléter très approximativement les grandes tendances. Sa valeur maximale, entre 35 et 60 % d'humidité relative, correspondrait à un abattement de 3 log₁₀ en 16 minutes. L'extension des résultats à 15°C nécessiterait une prise en compte explicite d'effets « seuil », et ce probablement pour

la stabilité de la capside dépendante des forces de cohésion intermoléculaires réduites par l'agitation thermique. Les coefficients d'inactivation calculés à partir des données publiées dans la littérature présentent, pour certains virus, le même type de dépendance à l'humidité relative de l'air avec des valeurs maximales toutefois plus faibles. Ils sont spécifiques à chaque virus ; pour certains virus, on peut avoir une dépendance à l'humidité très différente avec des maximums d'inactivation aux humidités fortes ou faibles.

Mots clés : réutilisation des eaux usées, irrigation, air, virus, inactivation

IV.1. Introduction

A l'échelle planétaire, on assiste à des problèmes croissants de ressources en eau, en quantité et en qualité (Renault et al., 2014 ; Van der Bruggen, 2010). Ces problèmes résultent de l'accroissement de la population mondiale et de l'urbanisation (Qadir et al., 2010 ; Kennedy et al., 2012), du changement climatique planétaire (Bates et al., 2008 ; Bixio et al., 2006), de la diversification des usages de l'eau (Asano, 1998), de la surexploitation d'aquifères (Taylor et al., 2012 ; Giungato et al., 2010), et du déversement d'eaux usées insuffisamment traitées dans les eaux conventionnelles (Van der Bruggen, 2010). Déjà pratiquée dans certains pays (Renault et al., 2014 ; Bixio et al., 2008), la réutilisation d'eaux usées en irrigation permet d'exploiter cette ressource marginale, limite leur rejet dans l'environnement, et contribue à fertiliser les cultures (N, P ...) (Jiménez et al., 2010 ; Keraïta et al., 2008 ; Ensink and van der Hoek, 2006). Elle présente toutefois des risques pour les productions agricoles, l'environnement et la santé (Renault et al., 2014 ; Van der Bruggen, 2010). Eu égard à la santé, les risques chimiques semblent secondaires au regard des risques microbiologiques pour les eaux usées d'origine domestique (Renault et al., 2014 ; Van der Bruggen, 2010). Les eaux usées brutes contiennent divers pathogènes, dont des virus entériques de l'homme (Pachepsky et al., 2011). Certains y sont systématiquement détectés, et leur abattement en station d'épuration est généralement faible en absence de traitement tertiaire adapté (La Rosa et al., 2010 ; Van den Berg et al., 2005). Ils sont de plus en plus souvent incriminés dans les épidémies d'origines hydrique (WHO, 2006 ; Reynolds, 2008 ; Craun et al., 2010) et alimentaire (Cook et D'Agostino, 2013). Les principaux virus incriminés sont les norovirus, les enterovirus (poliovirus, coxsackievirus, echovirus), les rotavirus, les adenovirus, et le virus de l'hépatite A (Rodríguez-Lázaro et al., 2012) ; et la commission du Codex Alimentarius a reconnu en 2012 que les virus entériques humains les plus fréquemment mentionnés comme responsables d'épidémies d'origine alimentaire sont le norovirus et le virus de l'hépatite A (CAC/GL 79-2012).

Apportés par les eaux usées lors d'irrigation, les virus entériques peuvent se déposer sur les parties aériennes des plantes ou à la surface du sol, être transportés dans le sol vers les racines des plantes, l'aquifère, atteindre des cours d'eau à proximité, ou être dispersés dans l'atmosphère. De nombreux travaux ont traité du devenir des virus dans le sol (Cao et al., 2010 ; Syngouna et Chrysikopoulos, 2010 ; Zhuang et Jin., 2008, parmi bien d'autres références), et quelques ont traité des possibilités d'internalisation de virus dans les plantes à partir des racines (DiCaprio et al., 2015 ; Hirneisen et Kniel, 2013 ; DiCaprio et al., 2012 ; Wei et al., 2011 et 2010 ; Urbanucci et al., 2009 ; Chancellor et al., 2006), ou d'attachement aux parties aériennes (Hirneisen et Kniel, 2013 ; Stine et al., 2005 ; Vega et al., 2005). En environnement intérieur, des contaminations *via* l'air par des virus entériques de l'homme avec symptômes à la clé ont été clairement démontrées au restaurant (Marks et al., 2000), à école (Marks et al., 2003) et en hôpital (Nenonen et al., 2014). Au niveau de la personne contaminée, le transfert peut alors combiner l'inhalation de virus, leur dépôt dans les voies respiratoires supérieures, et *in fine* leur déglutition avec le mucus des voies respiratoires (Nazaroff, 2011). *In situ*, la présence de virus entériques de l'homme dans l'air a été notée au voisinage des stations de traitement des eaux usées, en particulier pendant les épisodes venteux (Masclaux et al., 2014 ; Ziros et al., 2011 ; Fracchia et al., 2006 ; Carducci et al., 1995) et lors d'épandages de biosolides (Brooks et al., 2005). Nous avons montré très récemment que des virus déposés au sol pouvaient être remis en suspension dans l'atmosphère lors d'épisodes venteux (cf. chapitre III ; Girardin et al., 2015 sur le point d'être soumis). Un modèle d'évaluation quantitative des risques microbiens (QMRA), pour partie associé à une transmission

aérienne au champ, a été proposé par [Mara et al. \(2007\)](#), mais ce modèle ne prend pas explicitement en compte les phénomènes d'inactivation des virus après ré-aérosolisation.

On relie généralement l'inactivation des virus dans l'atmosphère à l'humidité relative de l'air et à sa température, aux rayonnements UV, et à l'O₃. En Provence à Avignon pendant la saison où les agriculteurs irriguent, l'humidité relative de l'air peut osciller entre environ 20 % par temps sec et des valeurs proches de la saturation lors de pluies, d'orages ou d'irrigations ; les températures peuvent osciller entre environ 10 et 40°C (Figure IV.1a). De la même façon, le rayonnement solaire global arrivant au sol semble atteindre en journée 340 J.h⁻¹.cm⁻² avec des fluctuations liées aux alternances jour-nuit et à la présence d'épisodes nuageux ; la teneur en O₃ fluctue entre un peu moins de 10 ppb jusqu'à 80 ppb (Figure IV.1b).

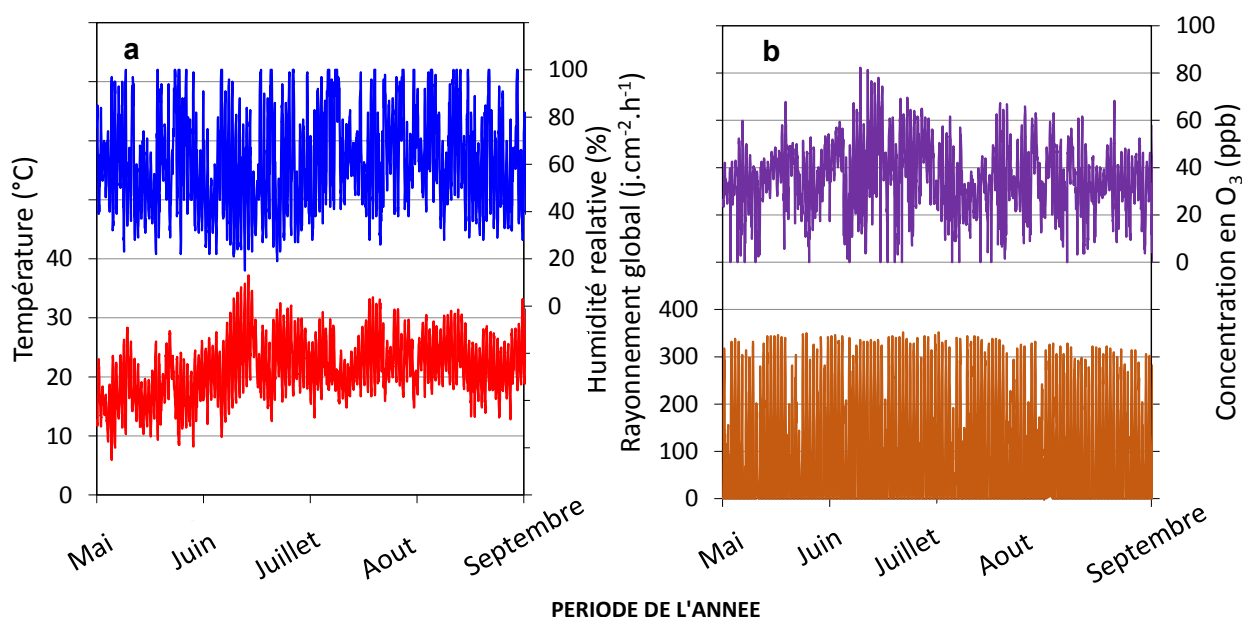


Figure IV.1 : Données météorologiques pour Avignon (84, France) entre mai et août 2014. (a) Température et humidité relative de l'air sous abris au niveau du Domaine Saint-Paul de l'INRA ; (b) Concentration en O₃ au niveau de la mairie d'Avignon mesurée par le réseau AirPACA et rayonnement global au niveau de du Domaine Saint-Paul de l'INRA.

Les travaux relatifs à l'inactivation de virus entériques de l'homme ou de virus modèles exposés à différentes conditions atmosphériques ont été basés sur des suivis d'infectiosité de virus mis en suspension dans l'air par des nébuliseurs, des atomiseurs ou des pulvérisateurs plus classiques dans des réacteurs ouverts ([McDevitt et al., 2012](#) ; [McDevitt et al., 2007](#) ; [Walker et al., 2007](#) ; [Jensen, 1964](#)) ou fermés ([Zhao et al., 2012](#) ; [Liu et al., 2012](#) ; [Tseng et Li, 2006](#) ; [Ijaz et Sattar, 1985a et b](#) ; [Sattar et al., 1984](#) ; [Adams et al., 1982](#) ; [Mik et al., 1977](#) ; [Akers et al., 1973](#) ; [Akers et al., 1968](#) ; [De Jong et Winkler, 1968](#) ; [Akers et al., 1966](#)), ou après dépôt de très petites quantités de suspension virale sur des supports variés ([Bae et al., 2014](#) ; [Hirneisen et Kniel, 2013](#) ; [Cannon et al., 2013](#) ; [Kim et al., 2012](#) ; [Jean et al., 2011](#) ; [Casanova et al., 2010](#) ; [D'Souza et al. 2006](#) ; [Stine et al., 2005](#) ; [Kukavica-Ibrulj et al., 2004](#) ; [Mbithi et al., 1991](#) ; [Abad et al., 2001, 1994](#) ; [Sattar et al., 1986](#) ; [Moe et Shirley, 1982](#)). Ces suivis allaient *a priori* au-delà d'une phase de « stabilisation initiale » du système ([Ijaz et al, 1985b](#) ; [Sattar et al., 1984](#) ; [Adams et al., 1982](#)) incluant au minimum l'évaporation de l'essentiel de l'eau des

microgouttelettes, voire éventuellement leur dépôt et l'attachement non réversible d'une partie des virus apportés sur les parois des réacteurs pour les virus en suspension, ou sur les supports pour les virus déposés.

Distinguer dans les diminutions en nombre de virus infectieux l'inactivation *sensu stricto* des virus de leur immobilisation sur des surfaces solides (non réversible avec les procédures expérimentales mises en œuvre) est alors essentiel. La correction des estimations d'inactivation par l'estimation de l'immobilisation des virus a parfois été directe grâce à l'utilisation de traceurs (Zhao et al., 2012 ; Sattar et al., 1984 ; Adams et al., 1982 ; Mik et al., 1977). Le génome des virus est le meilleur des traceurs tant que l'ARN ou l'ADN n'est pas altéré (voire seulement la zone reconnue par la sonde utilisée en (RT-) qPCR dans les conditions environnementales testées, mais seuls Zhao et al. (2012) ont utilisé ce traceur. Les autres travaux ayant eu recours à des traceurs pour corriger les estimations d'inactivation sont pour la plupart antérieurs au développement des applications de la biologie moléculaire à la virologie environnementale (Metcalf et al., 1995) ; les traceurs étaient alors des traceurs colorés – uranine (Zhao et al., 2012) ou rhodamine-B (Sattar et al., 1984) –, ou des traceurs microbiens – *Bacillus subtilis* var. Niger (Adams et al., 1982 ; Mik et al., 1977) –, bien que leur devenir pendant la phase de "stabilisation initiale" soit très certainement différent de celui des virus étudiés, et varie avec le traceur retenu (Zhao et al., 2012). La distinction entre inactivation et immobilisation des virus a parfois été indirecte avec distinction d'une phase initiale d'abattement très important du nombre de virus infectieux supposée liée à l'immobilisation de virus pendant la « stabilisation initiale » du système, et d'une phase ultérieure avec abattement souvent moins marqué semblant suivre une loi exponentielle et supposé lié à l'inactivation (Zhao et al., 2012 ; Moe et Shirley, 1982 ; Adams et al., 1982 ; De Jong et Winkler, 1968). Lorsqu'elle est appliquée à des virus déposés sur des supports, la deuxième étape peut malheureusement voir évoluer l'immobilisation des virus ; Girard et al. (2010) ont ainsi montré que des virus déposés sur un support en acier inoxydable semblent attachés de plus en plus fortement dans le temps. D'autres travaux permettraient une distinction entre phase de "stabilisation initiale" du système et phase d'inactivation lente, même si cette distinction n'a pas été faite explicitement (Bae et al., 2014 ; Casanova et al., 2010 ; D'Souza et al. 2006 ; Abad et al., 1994 ; Mbithi et al., 1991 ; Sattar et al., 1986 ; Ijaz et al., 1985a et b ; Sattar et al., 1984 ; Akers et al., 1966). Malheureusement, plusieurs travaux sur l'inactivation des virus en suspension dans des réacteurs atmosphériques fermés (Liu et al., 2012 ; Tseng et Li, 2006 ; Mik et al., 1977) ou déposés sur des supports (Kukavica-Ibrulj et al., 2004) semblent difficiles à exploiter tant la distinction entre inactivation et immobilisation semble délicate à faire pour expliquer les abattements expérimentaux de nombres de virus infectieux.

Les suivis d'inactivation en réacteurs ouverts ont un statut un peu spécial (McDevitt et al., 2012 ; McDevitt et al., 2007 ; Walker et al., 2007 ; Jensen, 1964). Avec des temps de séjours très courts (de moins d'1 s à 16 s), ils ont été utilisés pour caractériser des procédés d'assainissement/stérilisation très rapides de l'air avec utilisation de rayonnement UV-C, notamment de longueur d'onde proche de 254 nm, à forte intensité (de 0.1 et 26 J.m⁻²) bien que restant faibles au regard des doses préconisées pour détruire 99.99 % des virus (Lazarova, 2004). Si les rayonnements UV-C sont les plus efficaces pour altérer l'ADN et l'ARN avec des absorptions maximales de l'ADN aux alentours de 256 nm et de 200 nm (Veligura et al., 2005), les rayonnements solaires à ces longueurs d'onde sont absorbés par l'O₂, l'O₃ et d'autres constituants traces dans les hautes couches de l'atmosphère (le seuil au-delà duquel ils arrivent au sol se situe généralement entre 290 et 295 nm). Les suivis d'inactivation de virus en suspension en réacteurs fermés ou sur supports ont notamment montré que l'inactivation du poliovirus (De Jong et Winkler, 1968), du reovirus (Adams et al., 1982) et du rotavirus (Moe et Shirley, 1982) est maximale à des humidités relatives intermédiaires, aux alentours de 40-70 %. D'autres auteurs ont noté des résultats contrastés, avec une inactivation minimale aux humidités intermédiaires pour le rotavirus

(Ijaz et al., 1985b ; Sattar et al., 1984) et le poliovirus (Ijaz et al., 1985a). Les taux d'inactivation maximum mentionnés varient fortement : d'environ $0.02 \log_{10}.h^{-1}$ pour le rotavirus (Moe et Shirley, 1982) à plus de $3 \log_{10}.h^{-1}$ pour le Gumboro vaccine virus (Zhao et al., 2012). L'accroissement de température a toujours un effet positif sur les vitesses d'inactivation des virus exposés à l'air (Zhao et al., 2012 ; Ijaz et al., 1985a). A notre connaissance, très peu de travaux ont traité des effets de rayonnements UV et/ou de la teneur en O_3 à des doses ou teneurs environnementales ; on peut citer Hirneisen et Kniel (2013) et Stine et al. (2005) qui n'ont pas trouvé d'effet notable des rayonnements de type UV-A et UV-B sur l'inactivation du norovirus murin, du virus Tulane, du VHA, du calicivirus félin et du coliphage PRD1. On peut aussi citer Mik et al. (1977) qui ont montré qu' O_3 favorisait l'inactivation du bactériophage $\phi X174$ jusqu'à environ 20 ppb, teneur à peine supérieure aux teneurs atmosphériques de base. Ces auteurs montrent les effets de la présence de certains composés organiques. Au-delà, on peut envisager un effet indirect des rayonnements, y compris des UV-A et de certains rayonnements visibles, *via* les réactions (photo)chimiques dans l'air de la basse troposphère notamment en présence de NO_x ($NO+NO_2$) et de composés organiques volatils COV, et *via* les réactions (photo)chimiques en phase liquide dans les nuages, brouillards etc. notamment en présence de Fe ionisé et de composés organiques (Graedel et Crutzen, 1992). Elles affectent la concentration en O_3 et celles de différents radicaux libres au pouvoir oxydant très élevé, dont $HO\bullet$ (parfois qualifié de "détergent de l'atmosphère") et $HO_2\bullet$ (Graedel et Crutzen, 1992). Les supports sur lesquels les virus ont été déposés semblent avoir eu un effet sur l'inactivation : à titre d'exemple, l'inactivation du VHA semblait plus rapide sur acier inoxydable que sur céramique (Bae et al., 2014). Ainsi les résultats sur supports doivent-ils être pris avec beaucoup de prudence ; ils renseignent toutefois sur ce que pourrait être l'inactivation de virus aérosolisés adsorbés sur des colloïdes organiques ou minéraux du sol.

De nombreux travaux et synthèses bibliographiques ont traité de l'effet de variables environnementales pour des virus en milieux liquides : effet de la température (Bertrand et al., 2012), effet des rayonnements UV (McGuigan et al., 2012 ; Fugioka et Yoneyama, 2002), et effet de l' O_3 mais à des teneurs artificiellement élevées pour de la désinfection (Herbold et al., 1989). Toutefois, il s'agit de rester très prudent sur l'extrapolation de ces résultats au devenir de virus exposés à l'air.

Ce travail avait comme objectifs généraux d'évaluer et décrire l'inactivation du mengovirus comme modèle de picornavirus (virus hépatite A...) (Sano et al., 2015 ; Costafreda et al., 2006 ; Pinto et al., 2009) lorsque ce virus est exposé à l'air, et de revisiter des données publiées dans la littérature pour d'autres virus. Nous nous sommes focalisés sur les effets combinés de l'humidité relative de l'air et de la température ; quelques suivis nous ont permis d'aborder l'effet du rayonnement global, et l'effet de l' O_3 comme exemple de molécule oxydante présente dans l'atmosphère. En amont, ce travail a nécessité de concevoir un réacteur atmosphérique miniature adapté à un travail en laboratoire P2. Nous avons utilisé comme traceur du taux de récupération des virus apportés le nombre de copies de leur ARN valable tant que les conditions environnementales imposées ne sont pas propices à la dégradation de cet ARN.

IV.2. Matériels et méthodes

IV.2.a. Le virus

Nous avons utilisé la souche MC0 cytopathogène du mengovirus murin (MVM), initialement obtenue par [Martin et al. \(1996\)](#), qui nous a été aimablement fournie par le Pr. A. Bosch (Université de Barcelone, Espagne) avec les cellules Buffalo Green Monkey Kidney (BGM) (ref. ATCC : BGMK-DAF P17 (PTA-4594)) obtenues par [Barron et al. \(1970\)](#) et utilisées pour la production du virus.

Les mengovirus ont été produits en milieu Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) (Gibco®, réf. : 31966047, USA) complété avec 10 % (v/v) de sérum de veau foetal, (Gibco®, réf. : 10270098, USA), 5 % (v/v) d'acide aminé non essentiel (Fisher, réf. : 11350912), 1 % d'Antibiotique-Antifongique (Gibco®, Pénicilline Streptomycine (réf. : 15290-018) et Fungizone (réf. : 15290-018) sous une atmosphère à 9 % de CO₂ à 37°C. Un inoculum viral d'environ 10⁵ gc est mis en contact pendant 60 min avec des cellules BGM à 90% de confluence en flacons de 175 cm² (Greiner bio-one, réf. : 660175) ; le milieu de culture est renouvelé ensuite. Après 3 jours d'incubation, le milieu de culture est récupéré avec les cellules (sans action physique ou chimique pour décoller les cellules) et passé aux ultrasons pendant 10 cycles de 15 secondes chacun. La suspension ainsi obtenue est ensuite centrifugée pendant 5 min à 2700 g afin de faire sédimenter les débris cellulaires. Les virus du surnageant sont finalement concentrés et purifiés par ultracentrifugation à 76800 g pendant 2h30 sur coussin de 20 % de saccharose en EDTA NaCl. Le culot est remis en suspension dans 1 mL de PBS. L'inoculum a ensuite été aliquoté en lots de 30 µl en microtubes PCR et conservé à -22°C jusqu'à utilisation.

Pour chacune des cinétiques d'inactivation, 1 microtube PCR était décongelé à température ambiante (≈ 23°C) pendant 5 min environ, puis passé au Vortex pendant à nouveau environ 5 min.

La quantification du génome du mengovirus murin a été réalisée par RT-qPCR sur une Mx3005P PCR quantitative (Agilent Technologies, Santa Clara, CA, USA) sans étape de pré-concentration. En pratique, nous avons extrait environ 60 µL d'ARN viral à partir des 140 µL d'échantillon au moyen d'un kit d'extraction (kit QIAamp® Viral RNA (Qiagen®, réf. : 52906)). La RT-qPCR a été réalisée au moyen du kit RNA UltraSense® One-step Quantitative RT-PCR System (Life Technologies® réf. : 11732-927) avec les amorces : anti-sens 5' - GAAGTAACATATAGACAGACGCACAC - 3', sens GCGGGTCCTGCCGAAAGT et sonde TaqMan ATCACATTACTGGCCGAAGC décrite par [Pinto et al. \(2009\)](#) selon les recommandations du fabricant. La concentration finale de l'amorce anti-sens est de 1124 nM, 625 nM pour les amorces sens et 312 nM pour les sondes. Toutes les amplifications ont été réalisées avec l'appareil Mx3005P PCR quantitative (qPCR) (Agilent Technologies, France).

Les virus infectieux ont été quantifiés sur cellules BGM par dénombrement de plages de lyse en plaques 6 puits (Fisher, réf. : 10536952) en faisant l'hypothèse que chaque virus infectieux initie une plage de lyse distincte des autres. Pour chaque puits, 0.5 mL de la suspension virale à analyser était déposé sur une monocouche de cellules BGM ayant entre 70 et 90 % de confluence. Après 1 h de pré-incubation permettant l'adhésion des virus infectieux, les cellules étaient recouvertes par 2.5 mL d'un mélange composé pour moitié du milieu DMEM complété comme décrit précédemment et pour moitié de CMC (carboxyméthylcellulose à 3.2 % en eau physiologique), gélifiant permettant d'individualiser les plages de lyse (VWR, réf. : 276494N). Les cellules ont ensuite été incubées à 37°C pendant 3 j sous 9 % de CO₂. Après cette incubation, le milieu de culture était retiré et le tapis cellulaire rincé 2 fois par 2 mL de PBS 1 ×. Les plages de lyse sont alors révélées par mise en contact pendant 20 min du tapis cellulaire avec une solution de Crystal violet (2 % (w/v) (Sigma®, réf. : C0775), 20 % (v/v) d'Ethanol

absolu (Sigma-Aldrich®, réf. : 32221), 10 % de Formol à 37 % (Sigma-Aldrich®, réf. : 252549), 70 % d'Eau Milli RO)). La solution colorante était ensuite prélevée et les tapis cellulaires rincés plusieurs fois à l'eau. Les plages de lyse, en pratique des zones blanches sur fond violet, sont comptées. L'ensemble des opérations précédentes était répété pour 3 dilutions en DMEM des échantillons : 7, 70 et 700 avec 2 puits pour le dénombrement des virus chaque dilution. Pour les témoins les facteurs de dilutions réalisés sont 7, 70 et 700 et pour les échantillons 7, 70 et 350.

IV.2.b. Protocoles expérimentaux et plan d'expérience

IV.2.b.i. Le dispositif d'étude

Un réacteur a été assemblé par un artisan-verrier (GLI, Marseille, France) (Figure IV.2). Sa partie centrale est une enceinte quasi-cylindrique en borosilicate d'environ 800 mL de volume utile avec 12.5 cm de diamètre et environ 7.0 cm de hauteur internes. Elle est soudée à un compartiment inférieur lui-même en borosilicate dans lequel circule un mélange d'eau et de monopropylène glycol à la température de consigne. Le réacteur proprement dit est fermé à sa face supérieure par un disque en pirex, un joint torique étanchéifiant l'ensemble. Quatre ouvertures tubulaires GL45 à 90° l'une de l'autre permettent, pour 2 d'entre elles diamétralement opposées, le balayage de la partie centrale par un air reconstitué, et pour une 3^{ème} l'insertion d'une sonde de température PT100 recouverte de PTFE (Labomoderne, réf. : C13510).

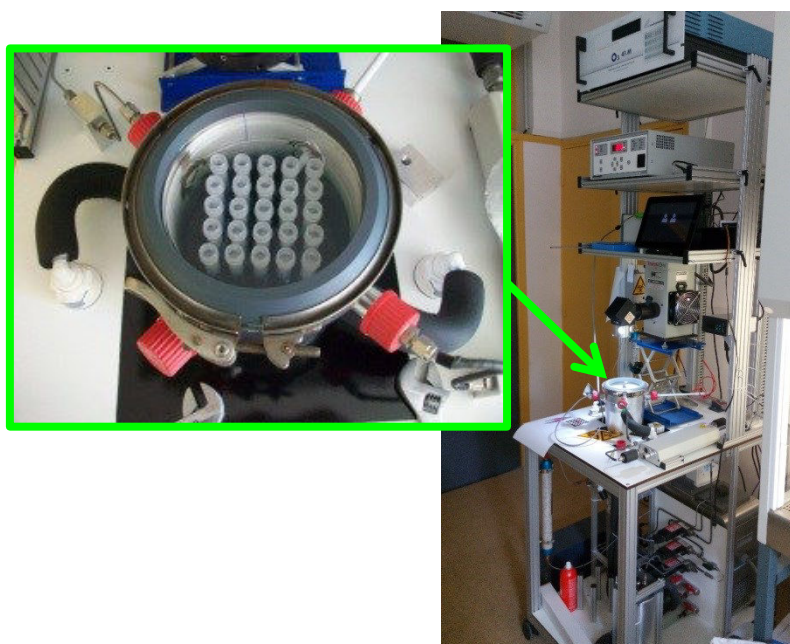


Figure IV.2 : Réacteur conçu pour suivre l'inactivation des virus sous diverses conditions atmosphériques.

La composition et la température de l'air balayant le réacteur étaient acquises progressivement en partant d'air sec reconstitué (80/20 de N₂/O₂).

L'humidité relative de l'air était obtenue par mélange d'air chargé à environ 80 % d'humidité relative par bullage dans une branche du circuit et d'air maintenu sec dans une autre branche, les débits étant régulés en amont de chacune des branches et le débit du mélange fixé à 20 mL.min⁻¹ était contrôlé en aval (Figure IV.3). Un thermo-hygromètre capacitif numérique (sensor SHT75 ; Sensirion®, Steafa,

Suisse), associé à une interface d'acquisition NI6008 (National Instrument), était positionné dans le tube amenant l'air au réacteur et servait à la régulation de l'humidité relative de l'air arrivant au réacteur. Un autre thermo-hygromètre (sensor SHT21 ; Sensirion®, Steafa, Suisse) de contrôle était positionné dans le cœur du réacteur.

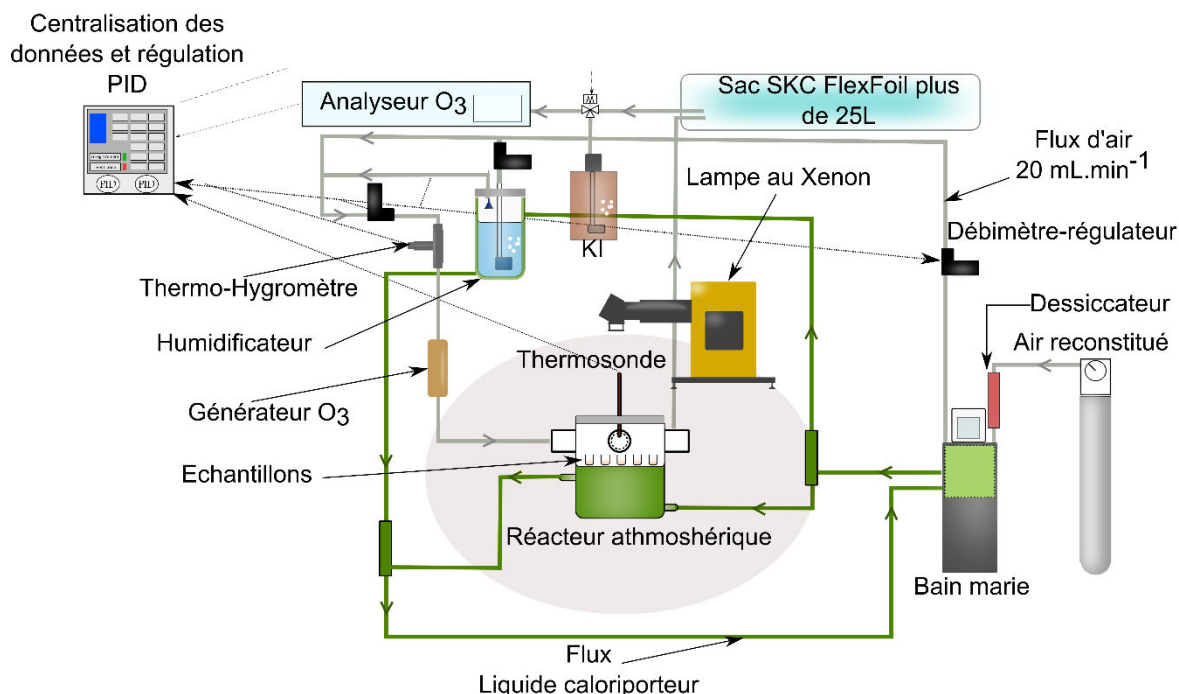


Figure IV.3 : Ensemble du dispositif permettant d'imposer et de contrôler les conditions d'humidité relative et de température de l'air, d'éclairement et de teneur en O₃ au sein du réacteur atmosphérique dédié à l'étude de l'inactivation des virus.

Une sonde à résistance de platine recouverte de PTFE (LaboModerne, pt100, réf. : C13506) utilisée pour le contrôle et la régulation de la température étaient placée dans le cœur du réacteur. Le téflon facilitait le nettoyage et la désinfection de la sonde.

Pour une expérience, une teneur de 300 ppb d'O₃ a été imposée en entrée de réacteur à l'aide d'une cellule génératrice d'O₃ Pen Ray® (UVP, US) prêtée par le Prof. H Wortham (LCE, Aix-Marseille Université, France) et fonctionnant par photolyse de l'O₂ à 184.95 nm. Le réglage de l'intensité de la lampe se fait manuellement. La cellule a été réglée pour cette teneur en O₃ hors expérience réelle ; l'air en sortie de réacteur vide était alors stocké dans un sac étanche de 25 L (SKS, réf. : 253-25) pour contrôle après de sa teneur en O₃ à l'aide d'un analyseur (Environnement SA, Poissy, France) devant être balayé à environ 2 L.min⁻¹ par l'air à analyser (incompatible avec une mesure directe en sortie de réacteur). Les gammes couvertes par ce dernier sont 0.001 à 10 ppm, un bruit de 0.5 ppb et une linéarité de 1 %.

Une lampe au Xénon (newcorp® USA) de 300 W, prêtée par le Prof. H Wortham (LCE, Aix-Marseille Université, France), a été utilisée pour quelques expériences. Son spectre d'émission, l'homogénéité de l'éclairement sur la cible visée, l'impact de la distance et la réponse du filtre en pyrex ont été caractérisés par un spectroradiomètre (Spectral Evolution, réf. : SR-500) entre 250 et 1020 nm.

Le spectre obtenu était proche du spectre du rayonnement solaire, à l'exception de rayonnements UV- C détectables (Figure IV.4). L'analyse ayant montré une forte hétérogénéité de l'intensité du rayonnement arrivant au réacteur (rayonnement maximum au centre de la zone visée et beaucoup plus faible en périphérie, résultats non présentés), un diffuseur en silice fondue (OE Edmund, réf. : #83-420) et un filtre infrarouge (OE Edmund, réf. : #45-648) ont été superposés au disque en pirex faisant office de couvercle.

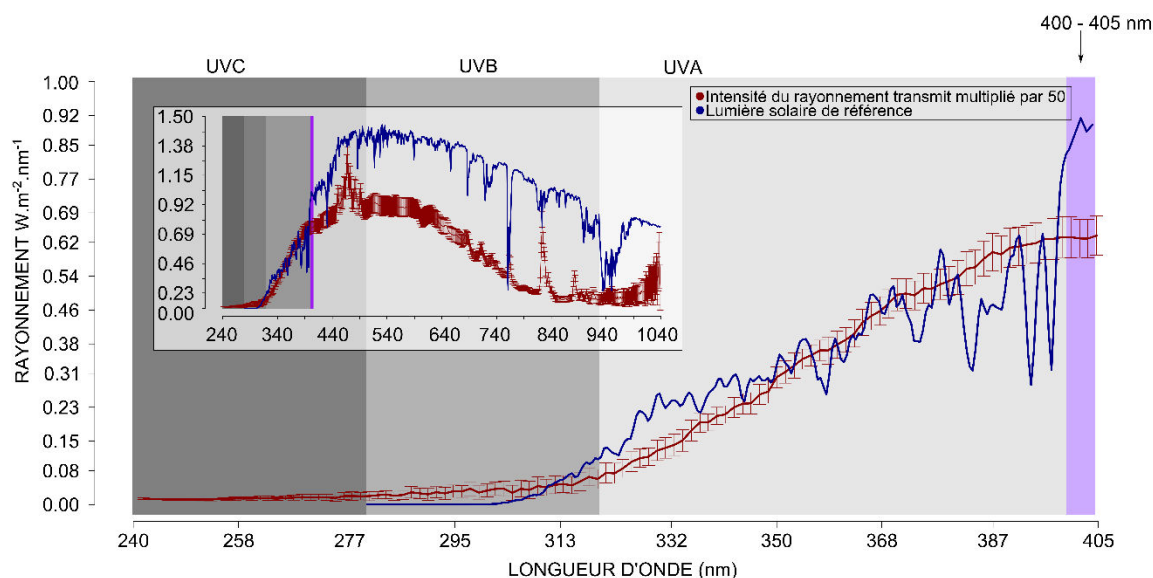


Figure IV.4 : Comparaison de l'intensité moyenne de la lampe et le rayonnement solaire de référence.

(G03 Committee, 2012). Pour ce graphique, l'intensité lumineuse de la lampe est multipliée par 50.

Avec ces ajouts, l'intensité du rayonnement de la lampe arrivant réellement au niveau des dépôts de virus était d'environ 2 % du rayonnement solaire au cours d'une journée d'ensoleillement de l'ordre de 600 W.m⁻² pour les rayonnements de longueur d'onde entre 300 et 400 nm.

IV.2.b.ii. *Protocole expérimental*

Pour chaque cinétique d'inactivation virale suivie, 1 µL de suspension virale correspondant approximativement à 10⁺⁶ gc et à entre 10⁺² pfu et 7.10⁺³ pfu était déposé initialement au fond de chacun de 25 cryotubes en polypropylène de 400 µL (Evergreen Scientifique, Los Angeles, CA, USA ; réf. : 222-3926-085) de 2 cm de hauteur et de 1 cm de diamètre interne, pour lesquels l'adhésion des virus pouvait être négligée. Un de ces tubes servait de témoin réacteur (tube fermé à humidité saturante). S'y ajoutait 1 témoin à la date initiale ($t=0$), en pratique 1 µL de suspension à laquelle étaient ajoutés immédiatement 300 µL de PBS au 10^{ème} ; 140 µL étaient immédiatement prélevés et stockés dans un tube Eppendorf® RNase-free en prévision d'analyses ultérieures en RT-qPCR, les 160 µL étant conservés à -22°C pour la culture cellulaire. A l'exception de ce dernier, les 25 tubes étaient placés sur un support en Plexiglass et insérés dans le réacteur atmosphérique permettant de les soumettre à des conditions homogènes de température, d'humidité relative, d'intensité de rayonnement et de concentration en O₃. A 6 dates différentes (20 min, 1, 2, 4, 6 et 10 h), 4 tubes étaient prélevés de manière aléatoire. Ils étaient alors immédiatement complétés par 300 µL de PBS au 10^{ème} (Fisher, BP399-1) et passés au Vortex pendant 5 min ; 140 µL étaient alors prélevés et stockés dans un tube Eppendorf®

RNAse-free. Les cryotubes et les tubes Eppendorf® étaient alors stockés à -22°C jusqu'à analyses respectivement du nombre de virus infectieux (pfu) et du nombre de copies génomiques (gc).

IV.2.b.iii. Plan d'expérience

Dix expériences en réacteur ont été suivies. Elles se différenciaient par la température (15, 25 et 40°C) et l'humidité relative de l'air (30, 50, 60, 65 et 80 %) imposées, par la présence ou non d'un rayonnement de composition spectrale proche de celle du rayonnement solaire mais d'intensité moindre (2 %), et par la teneur en O₃ entrant dans le réacteur (absence ou environ 300 ppb) (Tableau IV.1).

Tableau IV.1 : Caractéristiques des 10 expériences menées en réacteur atmosphérique. Toutes les expériences ont duré 10 h.

Expérience	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
T (°C)	25	25	25	25	25	25	15	15	40	40
Humidité relative (%)	80	65	50	30	80	80	60	60	80	80
Rayonnement	-	-	-	-	+	+	+	-	-	+
O ₃ (ppb)	0	0	0	0	0	300	0	0	0	0

IV.2.c. Modélisation des processus ; traitement des données expérimentales

Nous avons suivi parallèlement les évolutions du nombre de virus infectieux $N_{v-i}(t)$ (pfu) et du nombre de copies d'ARN viral $N_{v-t}(t)$ (gc), l'ARN viral étant utilisé comme traceur pour distinguer les virus immobilisés physiquement de ceux inactivés, lorsque les conditions n'affectent pas l'ARN (i.e. *a priori* toutes les conditions sans UV). Si une variation du nombre de copies d'ARN viral $n_{v-t}(t)$ était observée, elle devait nous conduire à calculer le taux de virus inactivés selon l'expression suivante :

$$I(t) = \frac{N_{v-i}(t)}{N_{v-i}(t=0)} \times \frac{N_{v-t}(t=0)}{N_{v-t}(t)} \quad (\text{IV.1})$$

En absence de variation significative cette expression peut se réduire à l'expression suivante utilisée très généralement sans aucune évaluation préalable ou parallèle d'une immobilisation physique des virus :

$$I(t) = \frac{N_{v-i}(t)}{N_{v-i}(t=0)} \quad (\text{IV.2})$$

Après apport d'une quantité de virus infectieux $N_{v-i}(t=0)$ (en pfu ou 'unité formant plaque') dans 1 µL de suspension, on suppose que le taux d'inactivation $\partial N_{v-i}/\partial t$ (pfu.h⁻¹) est proportionnel à la quantité de virus encore infectieux $N_{v-i}(t)$ (pfu) à une date t (h). On peut écrire :

$$\partial N_{v-i}(t)/\partial t = -k_i(HR, T, UV, O_3) \times N_{v-i}(t) \quad (\text{IV.3})$$

où $k_i(HR, T, UV, O_3)$ est le coefficient cinétique d'inactivation (h⁻¹), dépendant de l'humidité relative de l'air HR (%) au voisinage immédiat du virus, de la température T (°C), de la teneur en O₃ (ppb), et de l'énergie reçue en rayonnements efficaces (W.m⁻²). La prise en compte des dernières grandeurs n'est pas simple : effets directs ou indirects *via* la (photo)chimie de l'atmosphère, plages spectrales à prendre en compte selon que le rayonnement agit directement ou indirectement. Pour des conditions constantes d'humidité, l'intégration de l'équation (IV.3) aboutirait à l'équation suivante :

$$N_{v-i}(t) = N_{v-i}(t=0) \times \exp(-k_i(HR, T, UV, O_3) \times t) \quad (\text{IV.4})$$

Malheureusement, on peut penser que $k_i(HR, T, UV, O_3)$ varie fortement dans le temps avec la dessiccation presque totale des gouttelettes de suspension virale. Toutefois, l'équation (IV.4) peut être réécrite de manière plus générale pour k_i variant dans le temps :

$$N_{v-i}(t) = N_{v-i}(t=0) \times \exp\left(-\int_0^t k_i(HR, T, UV, O_3) \times dt\right) \quad (IV.5)$$

Soit :

$$\ln\left(\frac{N_{v-i}(t)}{N_{v-i}(t=0)}\right) = -\int_0^t k_i(HR, T, UV, O_3) \times dt \quad (IV.6)$$

En ayant une forme analytique décrivant la dépendance de k_i à un ou plusieurs facteurs parmi ceux précédemment évoqués (HR, T, UV, O_3), on peut envisager d'ajuster quelques constantes intervenant dans les formes analytiques à partir des données expérimentales.

Concernant plus spécifiquement l'effet de l'humidité relative de l'air, les résultats antérieurs montrent que l'inactivation des virus dans l'air est un phénomène cinétique sur plusieurs heures, voire quelques jours, fortement affecté par cette grandeur. Nous avons fait l'hypothèse de travail suivante : l'inactivation des virus est minimale ou nulle aux humidités relatives élevées, maximale aux humidités relatives intermédiaires, et intermédiaire aux humidités relatives les plus faibles. Une question, sans réponse à notre connaissance aujourd'hui, est alors de savoir si les résultats obtenus aux plus faibles humidités résultent d'une évolution à ces humidités ou d'une évolution temporaire aux humidités intermédiaires lors de la dessiccation progressive de microgouttelettes de suspension contenant ces virus. On peut imaginer que, vers la fin de la dessiccation d'une suspension virale (i.e. lorsque la pression de vapeur n'est plus saturante), des forces s'exercent entre protéines (ou régions de protéines) de la capside et molécules d'eau, mais que la vitesse des déformations en résultant dépende de l'humidité relative. Pour une température donnée, nous avons retenu un formalisme mathématique empirique décrivant la dépendance de la constante d'inactivation k_i (h^{-1}) à l'humidité relative de l'air HR (%) :

$$k_i(HR) = \alpha \times \left(\beta + (1 - \beta) \times \frac{(HR/HR_1)^{e_1}}{1 + (HR/HR_1)^{e_1}} \right) \times \left(\frac{((100 - HR)/(100 - HR_2))^{e_2}}{1 + ((100 - HR)/(100 - HR_2))^{e_2}} \right) \quad (IV.7)$$

où HR_1 et HR_2 sont les humidités relatives autour desquelles la valeur de k_i croît ou décroît plus ou moins fortement selon les valeurs de 2 exposants e_1 et e_2 , et α est une constante de proportionnalité (h^{-1}) et β une constante liée à l'inactivation en condition sèche (Figure IV.5 à titre d'exemple).

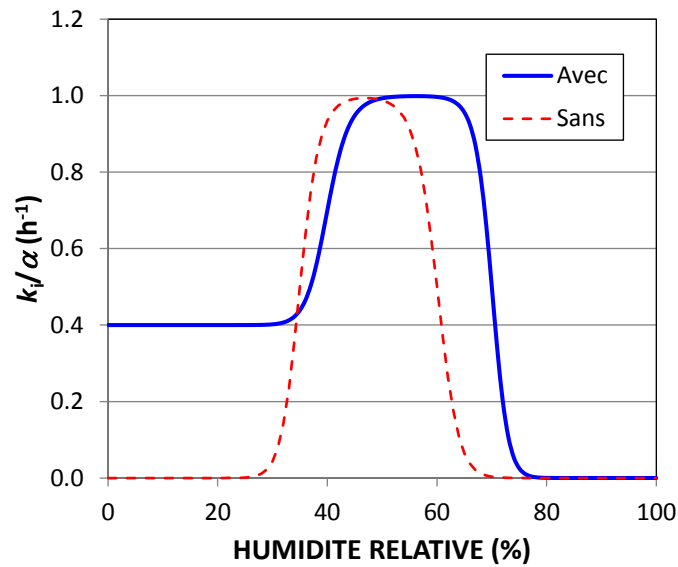


Figure IV.5 : Exemples de dépendance du rapport k_i/α à l'humidité relative. (Avec : $HR_1=40\%$, $HR_2=70\%$, $e_1=20$, $e_2=20$, $\beta=0.4$; Sans : $HR_1=40\%$, $HR_2=70\%$, $e_1=20$, $e_2=20$, $\beta=0$)

Nous avons appliqué ce formalisme à des cinétiques simplifiées d'évolution de l'humidité dans le réacteur atmosphérique. Nous avons supposé l'air entrant à l'humidité de consigne, un mélange parfait et instantané entre air entrant et air déjà présent dans le réacteur, une évaporation de l'eau de la suspension virale proportionnelle à l'écart entre humidité relative du réacteur et humidité saturante (100 %), et l'évaporation de la moitié de cette eau avant même que les tubes soient dans le réacteur. On peut alors simuler des inactivations intermédiaires aux humidités les plus faibles (Figure IV.6).

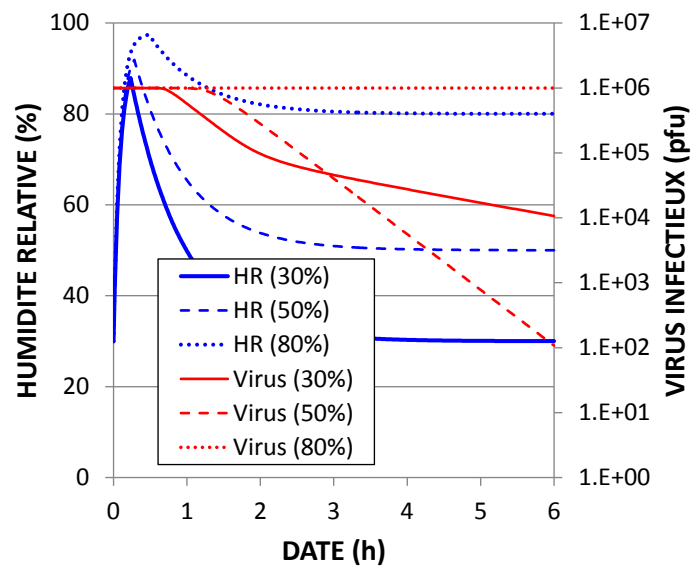


Figure IV.6 : Evolutions simulées de l'humidité relative dans le réacteur atmosphérique pour une valeur initiale de 30% et des valeurs visées de 30, 50 et 80% ; variations concomitantes du nombre de virus infectieux. ($HR_1=35\%$, $HR_2=60\%$, $e_1=20$, $e_2=20$, $\beta=0.2$).

La température peut affecter la vitesse d'évaporation des gouttelettes de suspension virale au minimum *via* son effet sur la pression de vapeur saturante (décrite dans notre travail par la formule de Clapeyron,

bien que ce ne soit qu'une approximation), et *via* la vitesse des modifications de structure de la capside supposée suivre une loi du Q_{10} avec Q_{10} compris entre 2 et 3. En ne tenant compte que de ces effets, on aboutit par exemple aux comparaisons de la Figure IV.7.

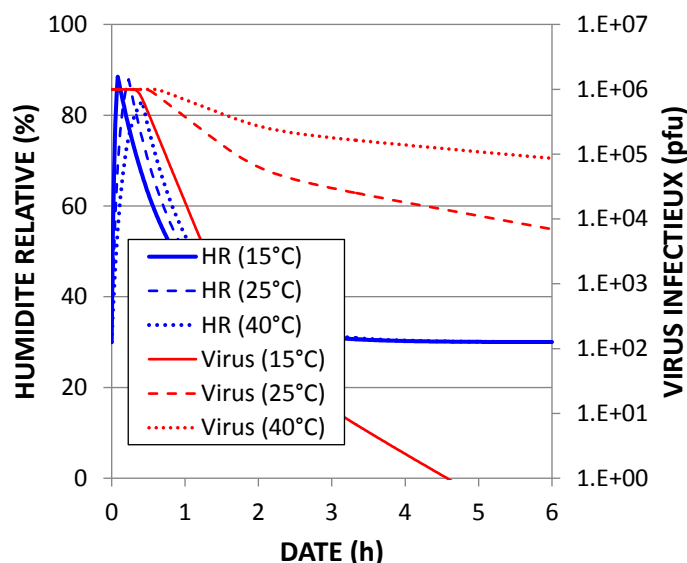


Figure IV.7 : Evolutions simulées de l'humidité relative dans le réacteur atmosphérique pour une valeur initiale de 30% et pour une visée de 30%, à 15, 25 et 40°C ; variations concomitantes du nombre de virus infectieux. ($HR_1=35\%$, $HR_2=70\%$, $e_1=20$, $e_2=20$, $\beta=0.2$).

La température peut agir simultanément sur les forces en jeu dans les changements de conformation de capside, notamment en modifiant les forces au niveau des différentes interfaces du système « polypropylène-eau-virus-air », et la stabilité même de l'assemblage des protéines dans la capside, car les forces de cohésion intermoléculaires sont réduites par l'agitation thermique (Auser et al., 2006; Phelps et al., 1995). La diminution de tension superficielle des interfaces 'air-eau' avec l'accroissement de température peut être négligée en première approche (74.22, 72.75, 71.18 et 69.56 mN.m⁻¹ à respectivement 10, 20, 30 et 40°C par exemple), mais la stabilité même des forces en jeu dans les assemblages de protéines peut changer et être spécifique à chaque virus.

Les données obtenues en absence de rayonnement et en absence d'O₃ ont été ajustées à 25°C en tenant compte des fluctuations réelles d'humidité relative de l'air dans le réacteur atmosphérique grâce à l'équation (IV.6) permettant d'intégrer explicitement les variations de $k_i(HR, T, UV, O_3)$ associées aux fluctuations d'humidité relative de l'air. Ces dernières ont été provoquées principalement par les ouvertures du réacteur aux dates de prélèvement des échantillons. Les paramètres estimés lors de cette étape ont été appliqués aux données disponibles à 15°C (absence de données à 40°C), en ne tenant compte de l'effet de la température que sur la vitesse des réactions (avec un Q_{10} entre 2 et 3) sans tenir compte d'effets de seuils dans les températures qui peuvent être prépondérants pour ce qui est des variations des forces de cohésion intermoléculaires avec l'agitation thermique.

IV.2.d. Analyse de jeu de données expérimentales de la littérature :

Nous avons revisité les données de la littérature traitant d'exposition des virus en suspension dans l'air de réacteurs fermés pour les quelques articles semblant permettre un traitement malgré l'absence de traceur (ou l'absence d'utilisation d'un traceur dans l'analyse des données) (Sattar et al., 1985 ; Ijaz et al., 1985a et b ; Adams et al., 1982 ; De Jong et Winkler, 1968 ; Ackers et al., 1966). Nous avons alors admis que les phénomènes autres que l'inactivation sont observés principalement dans les

premières minutes (voire la première heure) qui suivent l'aérosolisation des virus dans le réacteur (i.e. pendant la période où l'on observe parfois un abattement très marqué (en \log_{10}) du nombre de virus infectieux récupérables) ; certains auteurs parlent d'un effet « pulvérisation » (atomisation ou nébulisation) et/ou de « stabilisation initiale » qui peut correspondre en partie à une immobilisation partielle des microgouttelettes aux interfaces 'air-solides' dans le réacteur à laquelle se rajoute forcément la dessiccation initiale des microgouttelettes en suspension, voire auparavant l'effet de hautes pressions au niveau du nébuliseur ou de l'atomiseur. Nous avons utilisé les données de la période suivante où l'abattement semble très généralement ajustable par une fonction exponentielle. Nous avons fait l'hypothèse que la décroissance des virus infectieux dénombrés est alors liée à leur inactivation (cf. équation (IV.4)) ; le coefficient directeur de l'équation de la régression linéaire reliant les logarithmes népériens de ces nombres au temps écoulé depuis le début des incubations est alors égale à $-k_i$. Nous avons repris les données des différents auteurs et calculé de cette manière les k_i , et mis en relation ces valeurs à l'humidité relative de l'air.

IV.3. Résultats et discussions

IV.3.a. Niveau initial d'inoculation des tubes ; tests d'homogénéité entre expériences

Pour chacune des 10 expériences, le témoin à $t=0$ et le témoin réacteur ont été caractérisés en terme de nombre de copies génomiques d'ARN viral (Figure IV.8a) et de PFU (Figure IV.8b).

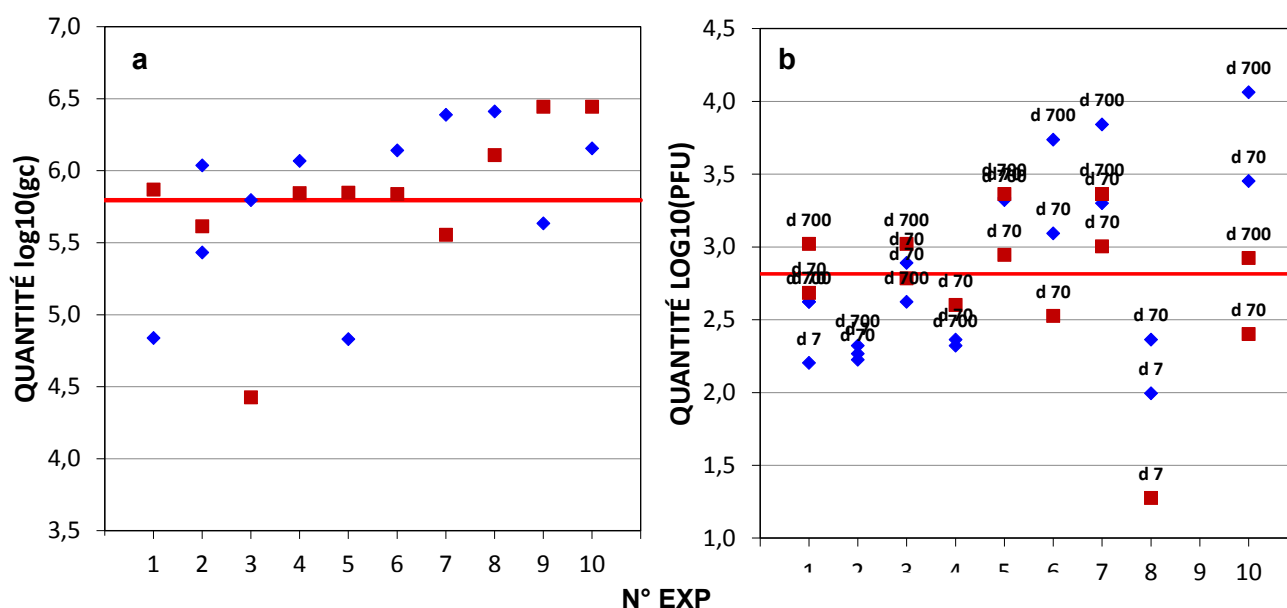


Figure IV.8 : Mesure des quantités de virus total et infectieux dans les témoins (carré rouge Température, losange bleu suspension) en gc et PFU.

Eu égard aux nombres de copies génomiques, des tests statistiques sur les différences de \log_{10} entre témoins à $t=0$ et témoins réacteurs ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les 2 types de mesures ($P>0.05$). Aussi, pour améliorer l'estimation de l'apport initial de virus, nous avons moyenné les mesures associées aux 2 types de témoins pour chaque expérience. Au vu des variations des quantités initiales de génomes entre expériences, cohérentes avec les valeurs aux dates ultérieures

(cf. section IV.3.b), on ne peut pas accepter l'hypothèse d'un niveau d'inoculation identique entre expériences.

Eu égard aux nombres de plaques formant colonies (PFU), des tests statistiques sur les différences de \log_{10} entre moyennes des témoins à $t=0$ et moyennes des témoins réacteurs ont montré qu'il n'y avait pas de différence significative entre les 2 types de mesures ($P>0.05$). Aussi avons moyenné les 2 types mesures associées aux 2 types de témoins pour chaque expérience.

Les virus infectieux représenteraient de 0.01 à 0.49% des copies génomiques d'ARN viral (en moyenne 0.16%).

IV.3.b. Evaluation du maintien des nombres de copies génomiques d'ARN viral

Les relations entre quantités d'ARN viral récupérées et durée d'incubation sont présentées dans la Figure IV.9. L'existence d'une relation linéaire entre quantité d'ARN et durée d'incubation a été testée sur les données sans les témoins.

On constate que, pour certaines expériences, les mesures sont systématiquement au-dessus ou en-dessous de la moyenne générale des témoins à $t=0$ et des témoins réacteurs commune à l'ensemble des expériences, confirmant le constat comme quoi les niveaux d'inoculation ont varié avec les expériences. Les coefficients de corrélation entre quantité d'ARN et durée d'incubation (hors valeurs des témoins) ne sont pas significatifs à 95 %, à l'exception de l'expérience n°2 (25°C, 65 % d'humidité relative (Figure IV.9b)). Ils sont compris entre -0.53 et 0.45 en absence d'O₃ et de rayonnement. Pour les 4 expérimentations avec rayonnement, ils sont compris entre 0.13 et 0.22 (0.14 pour celle avec simultanément apport d'O₃).

Les teneurs en copies génomiques virales extraites et dénombrées après 4 h sont comprises entre 30 et 270 % de l'apport estimé en absence d'O₃ et de rayonnement. Les taux de récupérations de l'ARN viral pour les 4 expérimentations avec rayonnement sont comprises entre 10 et 90 % de l'apport, et suggèrent un effet direct des rayonnements (qui comprennent quelques rayonnements UV-C) sur la séquence cible dosée. Dans ces expériences avec UV, l'expérience avec simultanément apport d'O₃ a eu un taux de récupération de l'ARN viral de 34%.

L'absence de tendance significative entre quantité d'ARN viral récupérée et durée d'incubation pour les expériences sans rayonnement ni apport d'O₃ nous ont amenés à ne pas corriger nos données sur les PFU. Nous avons donc utilisé l'équation (IV.2) pour calculer les niveaux d'inactivation à la place de l'équation (IV.1). Nous admettons que pour les autres expériences (avec rayonnement, voire avec apport d'O₃), les données de PFU ne sont pas à corriger pour les mêmes raisons.

IV.3.c. Inactivation des virus

Les relations entre quantités de virus infectieux récupérés et durée d'incubation sont présentées dans la Figure IV.10. L'expérience n°9 n'est pas présentée, n'ayant jamais détecté de virus infectieux (y compris sur les témoins). On n'observe aucune évolution du nombre de virus infectieux dans les expériences à 15°C (65 % d'humidité relative, sans et avec rayonnement (Figure IV.10g-h)) ; à l'inverse, l'inactivation est suffisamment rapide pour qu'on ne dénombre plus de virus infectieux dès 20 minutes d'incubation pour l'expérience à 40°C (Figure IV.10i), et pour l'expérience à 25°C pour la plus petite humidité relative testée (30 %) (Figure IV.10d)). Parmi les autres expériences sans rayonnement ni O₃, toutes à 25°C, l'inactivation serait d'autant plus rapide que l'humidité relative de l'air est faible : 80 % (Figure IV.10a) < 65 % (Figure IV.10b) < 50 % (Figure IV.10c) < 30 % (Figure IV.10d).

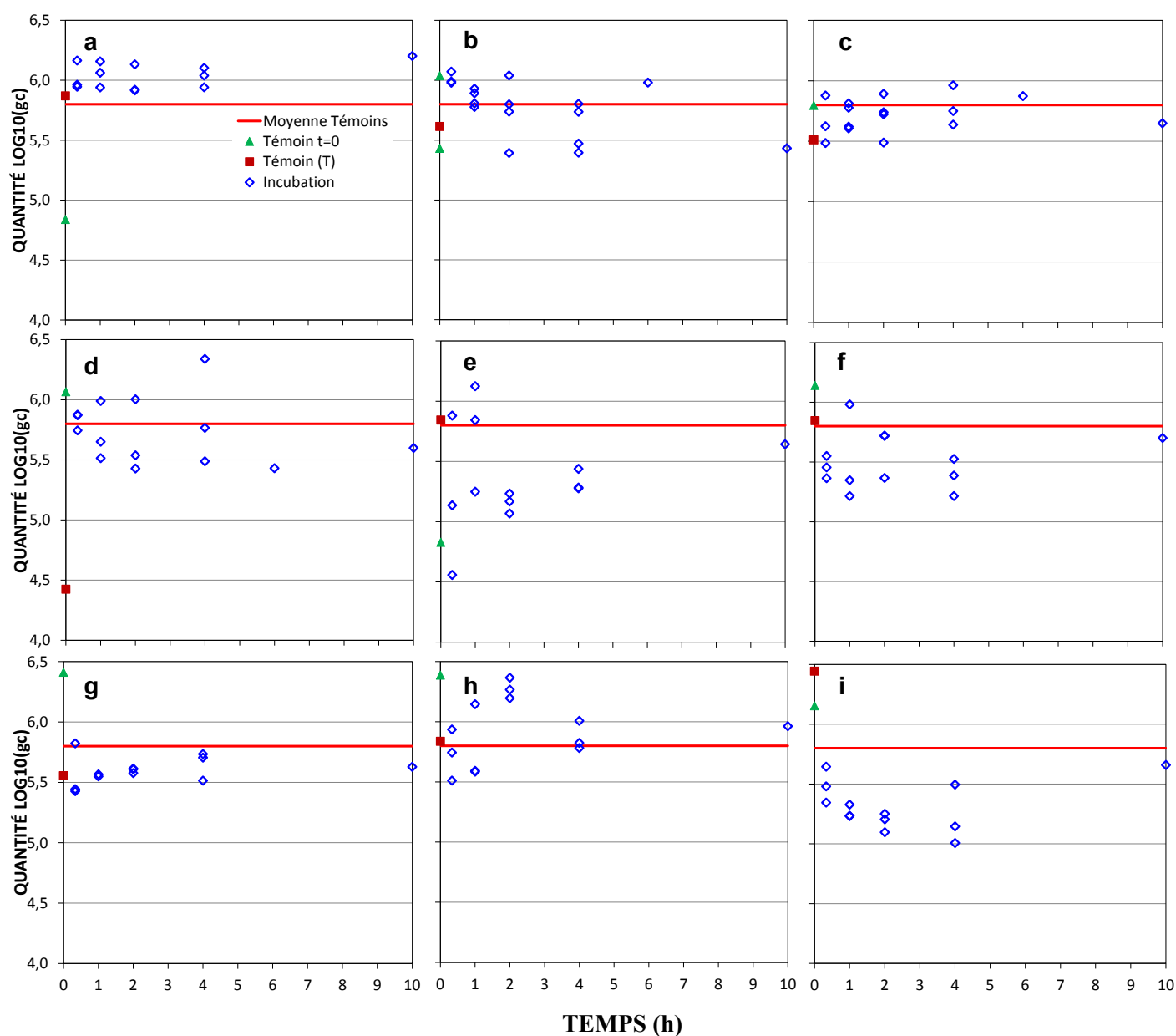


Figure IV.9 : Quantité de virus totale au cours du temps pour les expériences 25°C, 80 % d'humidité relative (a), 25°C, 65 % d'humidité relative (b), 25°C, 50 % d'humidité relative (c), 25°C, 30 % d'humidité relative (d), 25°C, 80 % d'humidité relative et rayonnement (e) et 25°C, 80 % d'humidité relative, rayonnement O₃ (f), 15°C, 65 % d'humidité relative (g), 15°C, 65 % d'humidité relative et rayonnement (h), 40°C, 80 % d'humidité relative et rayonnement (i). Les losanges représentent les échantillons, les carrés les témoins d'influence de la température et les triangles les témoins de la quantité de virus déposée. (La condition 40°C et 80% d'humidité sans UV correspondant à l'expérience n°9 a été éliminée en absence de PFU (y compris pour les témoins)).

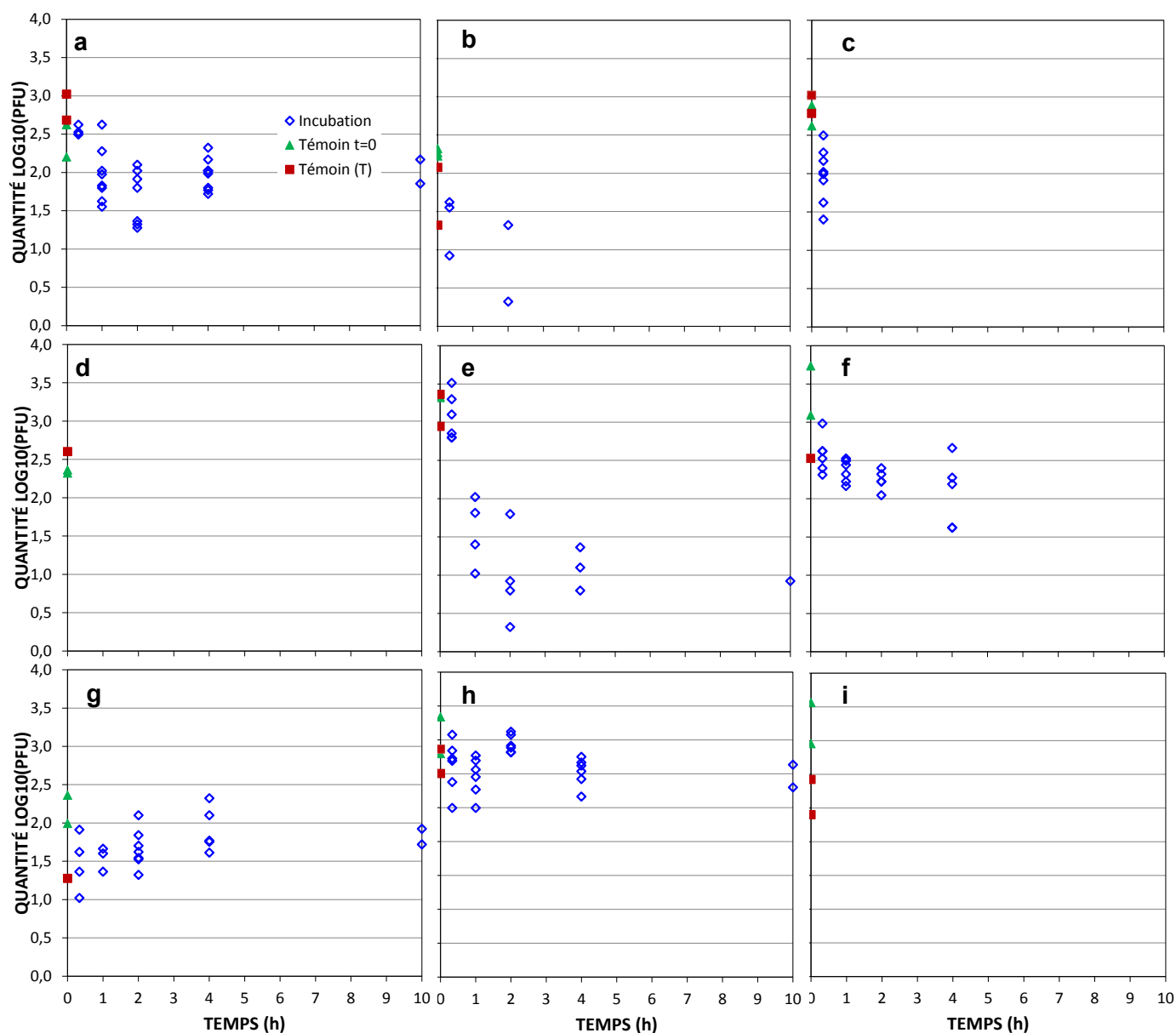


Figure IV.10 : Quantité de virus infectieux au cours du temps pour les expériences 25°C, 80 % d'humidité relative (a), 25°C, 65 % d'humidité relative (b), 25°C, 50 % d'humidité relative (c), 25°C, 30 % d'humidité relative (d), 25°C, 80 % d'humidité relative et rayonnement (e) 25°C, 80 % d'humidité relative, rayonnement O₃ (f), 15°C, 65 % d'humidité relative (g), 15°C, 65 % d'humidité relative et rayonnement (h) et 40°C, 80 % d'humidité relative et rayonnement (i).
(Les losanges représentent les échantillons, les carrés les témoins d'influence de la température et les triangles les témoins de la quantité de virus déposée).

Dans un premier temps, nous avons tenté d'ajuster le modèle présenté dans la section IV.2.c. aux données expérimentales à 25°C sans rayonnement ni O₃, et en tenant compte des fluctuations mesurées d'humidités relatives de l'air (Figure IV.11).

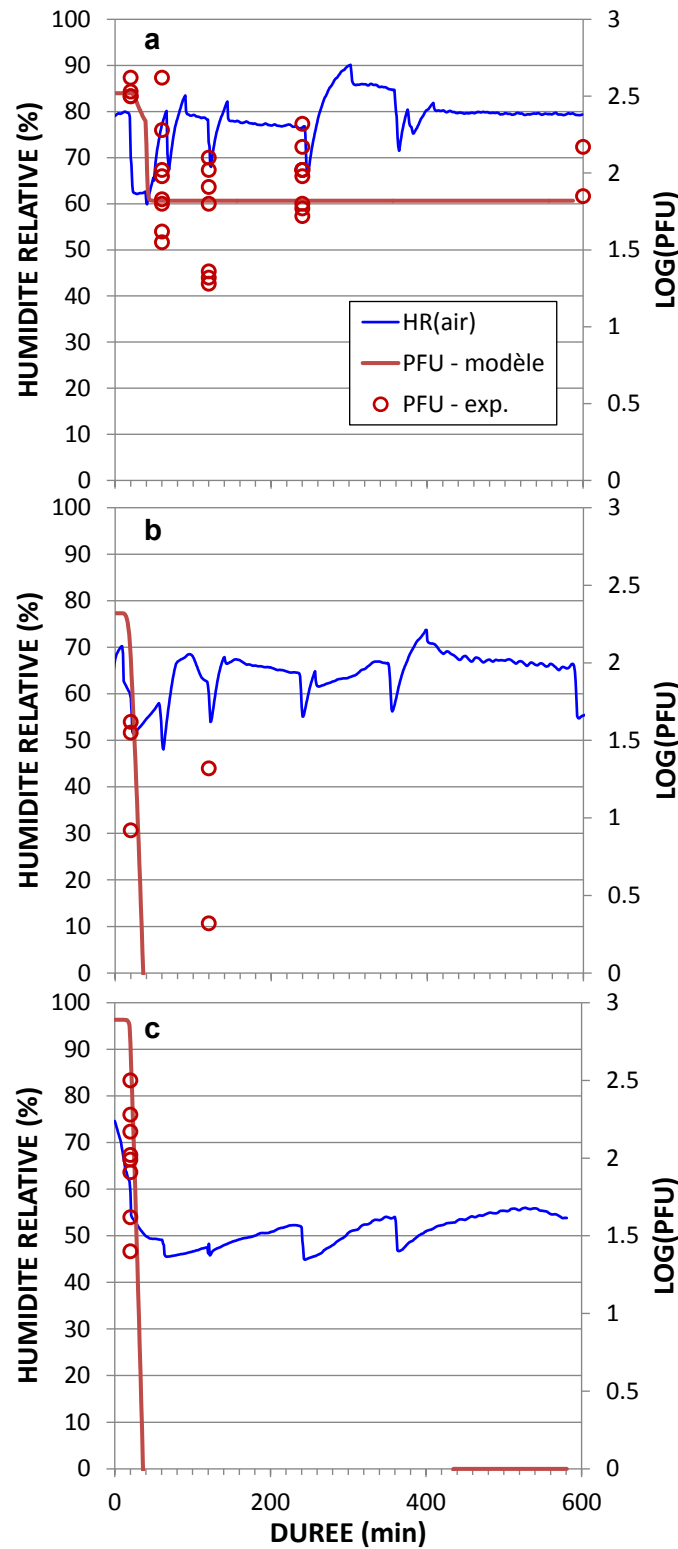


Figure IV.11 : Ajustement des PFU simulés aux PFU expérimentaux avec évaluation des coefficients intervenant dans la fonction $k_i(HR)$ décrite à l'équation (IV.6).

L'ajustement aboutit à la fonction présentée dans la Figure IV.12. Toutefois, le domaine des faibles humidités ayant à peine été exploré, une description différente de la fonction $k_i(HR)$ dans ce domaine aurait donné les mêmes ajustements.

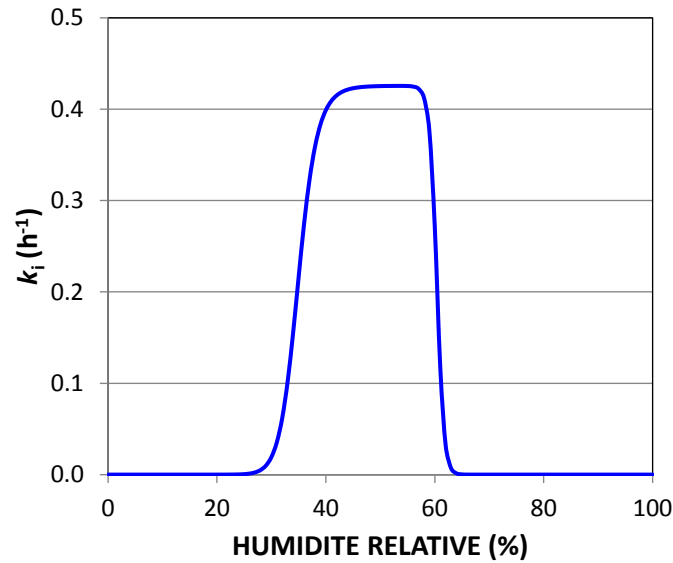


Figure IV.12 : Fonction $k_i(HR)$ aboutissant aux ajustements présentés dans la Figure IV.10.

$$k_i(HR) = 0.43 \times \left(\frac{(HR/34.9)^{20}}{1 + (HR/34.9)^{20}} \right) \times \left(\frac{((100 - HR)/(100 - 60.4))^{60}}{1 + ((100 - HR)/(100 - 60.4))^{60}} \right) \quad (IV.8)$$

Appliquée à l'expérience à 15°C et 60 % d'humidité relative, la fonction $k_i(HR)$, même divisée par 3 pour tenir compte des 10°C de baisse de température, prévoit une inactivation très rapide des virus alors qu'aucune inactivation n'est observée expérimentalement.

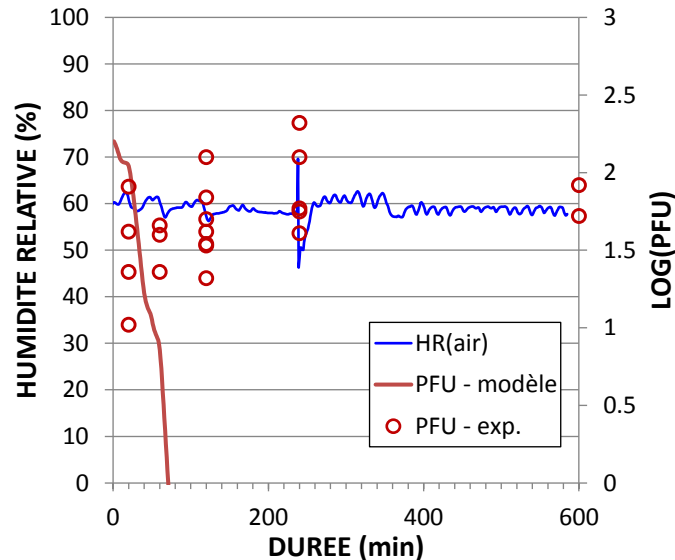


Figure IV.13 : Evolutions simulée et mesurée du nombre de virus infectieux (PFU) à 15°C et 60 % d'humidité relative en utilisant la fonction $k_i(HR)$ ajustée sur les données acquises à 25°C (cf. légende de la Figure IV.11).

De toute évidence, l'impossibilité de simuler correctement les données acquises à 15°C montrent que d'autres effets de la température doivent être pris en compte, dont très probablement un effet « seuil » sur la stabilité même de l'assemblage des protéines de la capsid, car les forces de cohésion intermoléculaires sont réduites par l'agitation thermique (Ausar et al., 2006 ; Phelps et al., 1995).

IV.3.d. Analyse des nombres de copies génomiques d'ARN viral

Nous avons revisité les données de Sattar et al. (1985), Ijaz et al. (1985a et b), Adams et al. (1982), De Jong et Winkler (1968), et Ackers et al. (1966). Nous avons utilisé les données, au-delà d'une phase initiale de quelques minutes à 1 heure, correspondant à une période où l'abattement semble lié à de l'inactivation *sensu stricto* et est ajustable par une exponentielle fonction de la durée d'incubation. Ces ajustements nous ont permis d'estimer des coefficients d'inactivation k_i .

De Jong et Winkler (1968) avaient procédé à ces calculs pour le poliovirus (Figure IV.14a) ; aux humidités relatives de l'air pour lesquelles nous avons accès aux données de bases (i.e. évolutions dans le temps du nombre de virus infectieux), nous avons fait nos propres calculs et retrouvé leurs estimations (Figure IV.14a). On constate que les estimations de coefficients d'inactivation dépendent fortement du virus (Figure IV.14) et de la température (Figure IV.14b).

Si beaucoup de résultats vont dans le sens d'un coefficient d'inactivation maximum aux humidités intermédiaires (Adams et al., 1982 ; De Jong et Winkler, 1968 ; Ackers et al., 1966), d'autres résultats amènent à une dépendance inversée à cette humidité (Sattar et al., 1985 ; Ijaz et al., 1985a et b). Curieusement pour le poliovirus, les 2 tendances sont calculées à partir des données de différents auteurs (Figure IV.14a). Pour le poliovirus, le coefficient d'inactivation maximum calculé atteint 3.6 à 45 % d'humidité relative de l'air et à 20 C, correspondant dans ces conditions à un abattement de 3 log₁₀ en moins de 2 h. Pour le rotavirus, le coefficient d'inactivation maximum calculé atteint 0.19 à 10 % d'humidité relative de l'air et à 20 C, correspondant dans ces conditions à un abattement de 3 log₁₀ en 36 h. Pour les virus ayant un coefficient d'inactivation maximum aux humidités intermédiaires, la plage d'humidité correspondant à l'inactivation très rapide du virus peut s'étendre d'environ 30-40 % à 60-70 % d'humidité relative de l'air. Enfin, Ackers et al. (1966) ont travaillé à 2 températures ; nos estimations de coefficient d'inactivation aboutissent à multiplier le coefficient d'inactivation maximal à 16°C par plus de 5 en passant à 26°C. Parallèlement, il semble que ce maximum soit obtenu pour des humidités relatives légèrement inférieures en augmentant de température.

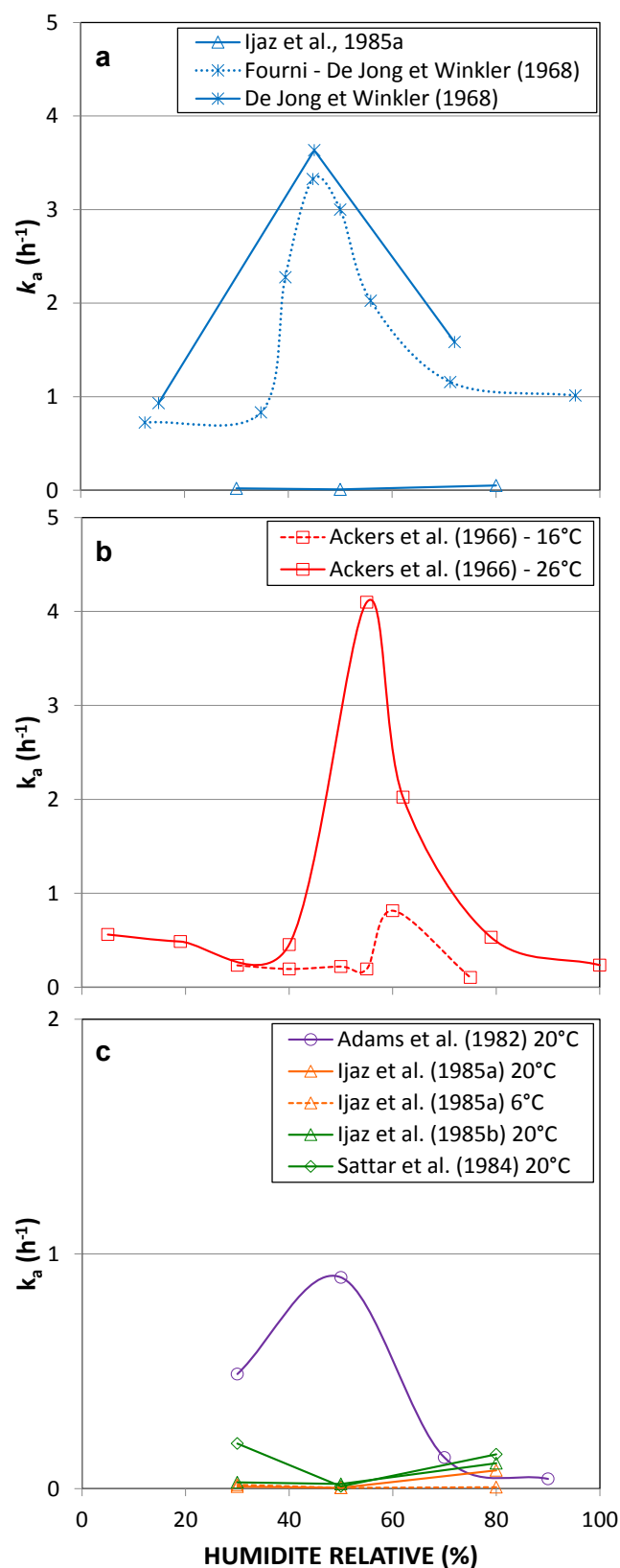


Figure IV.14 : Coefficients d'inactivation estimés à partir de travaux antérieurs basés sur des expérimentations pour des virus aérosolisés en réacteur atmosphérique fermé.

(a) Données acquises à 20°C sur poliovirus (De Jong et Winkler, 1968 ; Ijaz et al., 1985a), (b) Données sur Mauss Elberfeld virus (Ackers et al., 1966), (c) Données acquises sur reovirus (Adams et al., 1982), coronavirus humain (Ijaz et al., 1985a), rotavirus (Ijaz et al., 1985b), et rotavirus (Sattar et al., 1984).

IV.4. Conclusion

Ce travail avait comme objectif d'évaluer et décrire l'inactivation du mengovirus murin utilisé comme modèle du virus de l'hépatite A lorsque ce virus est exposé à l'air, et de revisiter des données publiées dans la littérature pour d'autres virus. Nous nous sommes focalisés sur les effets combinés de l'humidité relative de l'air et de la température ; quelques suivis nous ont permis d'aborder l'effet du rayonnement global, et l'effet de l'O₃ comme exemple de molécule oxydante dans l'atmosphère. Le travail a nécessité de concevoir un réacteur atmosphérique miniature adapté à un travail en laboratoire P2, et d'identifier un support permettant la récupération de l'essentiel des virus déposés au préalable. Nous avons utilisé comme traceur du taux de récupération des virus apportés le nombre de copies de leur ARN ; nous avons considéré ce traceur comme valable au minimum en absence de rayonnement et d'O₃. Nous avons considéré que l'humidité relative de l'air jouait sur l'inactivation du virus aux humidités relatives intermédiaires et nous avons proposé un modèle empirique pour décrire son effet.

Au niveau méthodologique, travailler sur des supports en polypropylène semble avoir permis de récupérer ensuite tous les virus pour une extraction au PBS au 10^{ème}. En absence d'O₃ et de rayonnement, les nombres de copies d'ARN viral extrait et dénombré après 4 h d'incubation sont compris entre 30 et 270 % de l'apport estimé. L'emploi du polypropylène ne permet malheureusement pas d'exclure un effet physique de ce support sur l'inactivation des virus, notamment aux humidités relatives de l'air où les forces aux niveaux des interfaces du système « air-virus-eau –polypropylène » pourraient être les plus importantes. Les taux de récupérations de l'ARN viral pour les 4 expérimentations avec rayonnement sont compris entre 10 et 90 % de l'apport, et suggèrent un effet direct des rayonnements incluant quelques rayonnements UV-C, bien que l'apport des virus dans une suspension de PBS ait probablement réduit les risques d'artefacts existant lorsqu'on apporte des composés photosensibilisants (notamment des matières organiques naturelles). L'expérience associant rayonnement et apport d'O₃ a abouti à un taux de récupération de l'ARN viral de 34%. Parmi les facteurs probablement les moins bien maîtrisés, on note les fluctuations d'humidité relative à chaque ouverture du réacteur suivies par un rétablissement lent de l'humidité de consigne en raison du faible débit de l'air balayant le réacteur. On note aussi que l'évaporation de l'eau des suspensions virales déposées dans chacun des cryotubes ne débutait pas simultanément ; il est probable qu'elle ait contribué à l'hétérogénéité des niveaux d'inactivation entre tubes à une même date d'échantillonnage.

A 25°C, la vitesse d'inactivation a augmenté avec la baisse de 80 % à 30 % de l'humidité relative de l'air. Aucune inactivation n'a été détectée à 15°C. Nous avons proposé un formalisme mathématique pour décrire la variation du coefficient d'inactivation k_i avec l'humidité relative de l'air. Il permet de simuler approximativement nos observations à 25°C, mais il prédit un abattement rapide de l'infectiosité à 15°C, alors que nos observations n'indiquent aucune évolution. Ce contraste suggère que certaines valeurs ou plages de températures jouent un rôle de seuil pour qu'un phénomène puisse se produire ; on peut penser notamment à la stabilité de la capsid qui dépend des forces de cohésion intermoléculaires réduites par l'agitation thermique. A 25°C, la valeur maximale trouvée du coefficient d'inactivation k_i est de 26 h⁻¹ ; elle correspondrait à un abattement de 3 log₁₀ en 16 min. Les coefficients d'inactivation calculés à partir des données publiées dans la littérature présentent, pour certains virus, le même type de dépendance à l'humidité relative de l'air avec des valeurs maximales toutefois plus faibles que la valeur que nous avons trouvée pour le mengovirus murin. Ils sont spécifiques à chaque virus ; pour certains, on peut avoir une dépendance à l'humidité très différente avec des maximums d'inactivation aux humidités fortes ou faibles.

Ce travail pourrait être amélioré, complété et poursuivi en s'attellant à différentes facettes du problème :

- l'amélioration des procédures pour avoir une meilleure maîtrise de la disparition initiale de l'eau des gouttelettes de suspension virale et pour réduire les perturbations d'humidité relative de l'air à chaque ouverture du réacteur ;
- l'amélioration de la compréhension des processus sous-jacents à l'effet de la température, dont notamment un effet sur la cohésion entre protéines constitutives de la capsid ;
- un travail sur les données obtenues sur supports publiées dans littérature.

Références:

- Abad F.X., Villena C., Guix S., Caballero S., Pintó R.M., et Bosch A. 2001. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3904-3907.
- Abad F. X., Pinto, R.M., et Bosch A. 1994. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3704-3710.
- Adams D.J., Spendlove J.C., Spendlove R.S., Barnett B.B., 1982. Aerosol stability of infectious and potentially infectious reovirus particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 903 –908.
- Akers T. G., Prato C.M., et Dubovi E.J. 1973. Airborne stability of simian virus 40. *Applied microbiology*, 26(2), 146-148.
- Akers T.G., Hatch M.T., 1968. Survival of a picornavirus and its infectious ribonucleic acid after aerosolization. *Appl. Microbiol.* 16, 1811–1813.
- Akers T.G., Bond S., Goldberg L.J., 1966. Effect of Temperature and Relative Humidity on Survival of Airborne Columbia SK Group Viruses. *Appl. Microbiol.* 14, 361–364.
- Ausar S. F., Foubert, T. R., Hudson, M. H., Vedvick, T. S., et Middaugh, C. R. 2006. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles effect of pH and temperature. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19478-19488.
- Bae S. C., Park S.Y., Kim A.N., Oh M.H., et Ha S.D. 2014. Survival of hepatitis A virus on various food-contact surfaces during 28days of storage at room temperature. *Food Research International*, 64, 849-854.
- Bates B.C., Kundzewicz Z.W., Wu S., Palutikof J.P. 2008. Climate Change and Water. *Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC Secretariat, Geneva, 210 pp.
- Bixio D., Thoeye C., De Koning J., Joksimovic D., Savic D., Wintgens T., et Melin T. 2006. Wastewater reuse in Europe. *Desalination*. Vol. 187, n°1–3, p. 89-101.
- Butot S., Putallaz T., Amoroso R., et Sanchez G. 2009. Inactivation of enteric viruses in minimally processed berries and herbs. *Applied and environmental microbiology*, 75(12), 4155-4161.
- CAC/GL 79-2012. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food. Codex alimentarius. International Food Standards.
- Cannon J. L., Kotwal G., et Wang Q. 2013. Inactivation of Norovirus Surrogates after Exposure to Atmospheric Ozone. *Ozone: Science & Engineering*, 35(3), 217-219.
- Cao H., Tsai F.T.C., et Rusch K.A. 2010. Salinity and soluble organic matter on virus sorption in sand and soil columns. *Groundwater*, 48(1), 42-52.
- Casanova L.M., Jeon S., Rutala W.A., Weber D.J., et Sobsey M.D. 2010. Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 76(9), 2712-2717.
- Carducci A., Arrighi S., Ruschi A. 1995. Detection of coliphages and enteroviruses in sewage and aerosol from an activated sludge wastewater treatment plant. *Letters in Applied Microbiology* 21, 207-209.
- Chancellor D.D., Tyagi S., Bazaco M.C., Bacvinskas S., Chancellor M.B., Dato V.M., de Miguel F. 2006. Green onions: potential mechanism for hepatitis A contamination. *Journal of Food Protection* 69, 1468-1472.
- Cook N., et D'Agostino M. 2013. Prevalence and control of hepatitis A virus in fresh produce. *Food Borne Viruses and Prions and Their Significance for Public Health*, 169.
- Costafreda M.I., Bosch A., Pintó R.M. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 804-810.
- Craun G.F., Brunkard J.M., Yoder J.S., Roberts V.A., Carpenter J., Wade T., Calderon R.L., Roberts J.M., Beach M.J., Roy S.L. 2010. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 507-528.
- De Jong J.C., et Winkler K. C. 1968. The inactivation of poliovirus in aerosols. *Journal of Hygiene*, 66(04), 557-565.

- DiCaprio E., Culbertson D., et Li J. 2015. Evidence of the Internalization of Animal Caliciviruses via the Roots of Growing Strawberry Plants and Dissemination to the Fruit. *Applied and environmental microbiology*, 81(8), 2727-2734.
- D'Souza D. H., Sair A., Williams K., Papafragkou E., Jean J., Moore C., et Jaykus L. 2006. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *International journal of food microbiology*, 108(1), 84-91.
- Ensink J.H.J., Van der Hoek W. 2006. Raw wastewater use in agriculture; risk versus benefits. In *Health Impact Assessment for Sustainable Water Management Edited by Lorna Fewtrell and David Kay*. Published by IWA Publishing, London, UK, Chapter 10, pp. 233-248.
- Fracchia L., Pietronave S., Rinaldi M., Martinotti M.G. 2006. Site-related airborne biological hazard and seasonal variations in two wastewater treatment plants. *Water Research* 40, 1985-1994.
- Giungato P., Nardone E., Notarnicola L. 2010. Reclamation of treated wastewater in the Apulia región (Italy): state of the art and future perspectives. *J. Commodity Sci. Technol. Quality* 49, 105-120.
- Girard M., Ngazoa S., Mattison K., et Jean J. 2010. Attachment of noroviruses to stainless steel and their inactivation, using household disinfectants. *Journal of Food Protection®*, 73(2), 400-404.
- Graedel T.E. et Crutzen P.J. 1992 Atmospheric change. An earth system perspective. *W.H. Freeman and Company*, New York.
- Hirneisen K. A., et Kniel K. E. 2013. Norovirus surrogate survival on spinach during preharvest growth. *Phytopathology*, 103(4), 389-394.
- Ijaz M. K., Brunner A. H., Sattar S. A., Nair R. C., et Johnson-Lussenburg C. M. 1985a. Survival characteristics of airborne human coronavirus 229E. *Journal of General Virology*, 66(12), 2743-2748.
- Ijaz M.K., Sattar S.A., Johnson-Lussenburg C.M., Springthorpe V.S., 1985b. Comparison of the airborne survival of calf rotavirus and poliovirus type 1 (Sabin) aerosolized as a mixture. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 289-293.
- Jean J., Morales-Rayas R., Anoman M.N., et Lamhoujeb S.. 2011. Inactivation of hepatitis A virus and Norovirus surrogate in suspension and on food-contact surfaces using pulsed UV light (pulsed light inactivation of food-borne viruses). *Food Microbiol.* Vol. 28, n°3, p. 568-572.
- Jensen M.M. 1964. Inactivation of airborne viruses by ultraviolet irradiation. *Applied microbiology*, 12(5), 418-420.
- Jiménez B., Drechsel P., Koné D., Bahri A., Raschid-Sally L., Qadir M. 2010. Wastewater, sludge and excreta use in developing countries: an overview. In: *Wastewater Irrigation and Health Assessing and Mitigating Risk in Low-Income Countries* (Drechsel P., Scott C.A., Raschid-Sally L., Redwood M., Bahri A. eds.), 3-27.
- Keraita B., Jiménez B., Drechsel P. 2008. Extent and implications of agricultural reuse of untreated, partly treated and diluted wastewater in developing countries. *CAB reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources* 3, 1-15.
- Kennedy C., Baker L., Dhakal S., Ramaswami A. 2012. Sustainable urban systems: an integrated approach. *Journal of Industrial Ecology* 16, 775-779.
- Kim S.J., Si, J., Lee J.E., et Ko G. 2012 Temperature and humidity influences on inactivation kinetics of enteric viruses on surfaces. *Environmental science & technology*, 46(24), 13303-13310.
- Kukavica-Ibrulj I., Darveau A., Jean J., et Fliss I. 2004. Hepatitis A virus attachment to agri-food surfaces using immunological, virological and thermodynamic assays. *Journal of applied microbiology*, 97(5), 923-934.
- La Rosa G., Pourshaban M., Iaconelli M., Muscillo M. 2010. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali del l'Istituto superiore di sanità* 46, 266-273.
- Liu K., Wen Z., Li N., Yang W., Wang J., Hu L., Dong X., Lu J., Li J. 2012. Impact of Relative Humidity and Collection Media on Mycobacteriophage D29 Aerosol. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1466-72. doi:10.1128/AEM.06610-11.

- Mbithi J. N., Springthorpe V.S., et Sattar S.A. 1991. Effect of relative humidity and air temperature on survival of hepatitis A virus on environmental surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), 1394-1399.
- Mara D.D., Sleigh P.A., Blumenthal U.J., Carr R.M. 2007. Health risks in wastewater irrigation: Comparing estimates from quantitative microbial risk analyses and epidemiological studies. *Journal of Water and Health* 5, 39-50.
- Marks P.J., Vipond I.B., Carlisle D., Deakin D., Fey R.E., Caul E.O. 2000. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiology and Infection* 124, 481-487.
- Marks P.J., Vipond I.B., Regan F.M., Wedgwood K., Fey R.E., Caul E.O. 2003. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiology and Infection* 131, 727-736.
- Masclaux F.G., Hotz P., Gashi D., Savova-Bianchi D., Oppliger A. 2014. Assessment of airborne virus contamination in wastewater treatment plants. *Environmental Research* 133, 260-265.
- McDevitt J.J., Lai K.M., Rudnick S.N., Houseman E.A., First M.W., Milton D.K., 2007. Characterization of UVC Light Sensitivity of Vaccinia Virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5760–5766. doi:10.1128/AEM.00110-07
- McDevitt J.J., Rudnick S.N., Radonovich L.J., 2012. Aerosol Susceptibility of Influenza Virus to UV-C Light. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1666–1669. doi:10.1128/AEM.06960-11
- Metcalf T.G., Melnick J.L., Estes M.K. 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology* 49, 461-87.
- Mik G., de Groot I., Gerbrandy J.L., 1977. Survival of aerosolized bacteriophage phi X174 in air containing ozone--olefin mixtures. *J. Hyg. (Lond.)* 78, 189–198.
- Moe K., et Shirley J. A. 1982. The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. *Archives of virology*, 72(3), 179-186.
- Nazaroff W.W. 2011. Norovirus, gastroenteritis, and indoor environmental quality. *Indoor Air* 21, 353-356.
- Nenonen N.P., Hannoun C., Svensson L., Torén K., Andersson L.M., Westin J., Bergström T. 2014. Norovirus GII. 4 detection in environmental samples from patient rooms during nosocomial outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 2352-2358.
- Pachepsky Y., Shelton D.R., McLain J.E.T., Patel J., Mandrell R.E. 2011. Irrigation as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. *Advances in Agronomy* 113 (Chapter two), 73-138.
- Phelps D.K., Rossky P.J., Post C.B. 1995. Influence of an antiviral compound on the temperature dependence of viral protein flexibility and packing: a molecular dynamics study. *J Mol Biol* 254, 544–551.
- Pinto R.M., Costafreda M.I., et Bosch A. 2009. Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A . *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 75, n°23, p. 7350-7355.
- Qadir M., Bahri A., Sato T., et Al-Karadsheh E. 2010. Wastewater production, treatment, and irrigation in Middle East and North Africa . *Irrig. Drain. Syst.* Vol. 24, n°1, p. 37-51.
- Reynolds K.A, Mena K.D, et Gerba C.P. 2008. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States . *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 192, p. 117-158.
- Renault P. 2014. Wastewater quality and required water quality for irrigation purposes. (Climate-KIC).
- Rodríguez-Lázaro D., Cook N., Ruggeri F.M., Sellwood J., Nasser A., Nascimento M.S.J., D'Agostino M., Santos R., Saiz J.C., Rzeżutka A., Bosch A., Gironés R., Carducci A., Muscillo M., Kovač K., Díez-Valcarce M., Vantarakis A., Bonsdorff C-H, Roda Husman A.M., Hernández M., Poel W.H.M. 2012. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiology Reviews* 36:786–814.
- Sano D., Ohta T., Nakamura A., Nakagomi T., Nakagomi O., et Okabe S. 2015. Culture-Independent Evaluation of Nonenveloped-Virus Infectivity Reduced by Free-Chlorine Disinfection. *Applied and environmental microbiology*, 81(8), 2819-2826.

- Sattar S. A., Lloyd-Evans, N., Springthorpe V.S., et Nair R.C. 1986. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *Journal of hygiene*, 96(02), 277-289.
- Sattar S.A., Ijaz, M.K., Johnson-Lussenburg C.M., Springthorpe V.S., 1984. Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 879–881.
- Stine S.W., Song I., Choi C.Y., Gerba, C.P. 2005. Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce. *J. Food Prot.* 68, 913–918.
- Syngouna V.I., et Chrysikopoulos C.V. 2010. Interaction between viruses and clays in static and dynamic batch systems. *Environmental science & technology*, 44(12), 4539-4544.
- Taylor R.G. et al. 2012. Ground water and climate change. *Nature Climate Change*, published online.
- Tseng C.C., Li C.S. 2006. Ozone for inactivation of aerosolized bacteriophages. *Aerosol Sci. Technol.* 40, 683–689. doi:10.1080/02786820600796590
- Urbanucci A., Myrmel M., Berg I., Von Bonsdorff C. H., et Maunula L. 2009. Potential internalisation of caliciviruses in lettuce. *International journal of food microbiology*, 135(2), 175-178.
- Van der Bruggen, B. 2010. The global water recycling situation. *Sustainability Science and Engineering*, 2, 41-62.
- Vega E., Smith J., Garland J., Matos A., et Pillai S.D. 2005. Variability of virus attachment patterns to butterhead lettuce. *Journal of Food Protection®*, 68(10), 2112-2117.
- Veligura A., Khuler M., Fritzsche W., Scharff P., Risch K., Lytvyn P., Gorchinskyy A., Buzaneva E. 2006. UV-Induced DS (SS)-DNA Damage: Optical and Electrical Recognition. In Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on "Cell Biology and Instrumentation: UV Radiation, Nitric Oxide and Cell Death in Plants" (Y. Blume, D.J. Durzan, P. Smertenko Eds), 371, 109-121.
- Walker C.M., Ko G., 2007. Effect of Ultraviolet Germicidal Irradiation on Viral Aerosols. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5460–5465.
- Wei J., Jin Y., Sims T., et Kniel K. E. 2010. Manure-and biosolids-resident murine norovirus 1 attachment to and internalization by Romaine lettuce. *Applied and environmental microbiology*, 76(2), 578-583.
- Wei J., Jin Y., Sims T., Kniel K.E. 2011. Internalization of murine norovirus 1 by *Lactuca sativa* during irrigation. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2508-2512.
- WHO 2006. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Geneva : WHO (World Health Organization).
- Zhao Y., Aarnink, A.J.A., Dijkman R., Fabri T., De Jong M.C.M., Groot Koerkamp P.W.G., 2012. Effects of Temperature, Relative Humidity, Absolute Humidity, and Evaporation Potential on Survival of Airborne Gumboro Vaccine Virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1048–1054. doi:10.1128/AEM.06477-11
- Zhuang J., et Jin, Y. 2008. Interactions between viruses and goethite during saturated flow: Effects of solution pH, carbonate, and phosphate. *Journal of contaminant hydrology*, 98(1), 15-21.
- Ziros P.G., Kokkinos P.A., Legaki E., Vantarakis A. 2011. Development of an optimized method for the detection of airborne viruses with real-time PCR analysis. *Virology Journal* 8, 369-37

Chapitre V) Conclusion et perspectives

La réutilisation des eaux usées en irrigation est une pratique courante, voire essentielle dans certains pays ; elle est amenée à prendre plus d'ampleur avec la croissance démographique, les changements globaux, l'urbanisation et la diversification des usages de l'eau. Les eaux usées contiennent divers pathogènes, notamment des virus responsables de nombreuses épidémies d'origine hydrique ou alimentaire. Aussi cette thèse de Doctorat avait-elle pour objectifs (i) d'évaluer et décrire l'aérosolisation des virus préalablement apportés au sol avec les eaux usées, (ii) d'évaluer et décrire leur inactivation dans l'atmosphère et initialement, (iii) de coupler dans un modèle aérosolisation, inactivation et transfert atmosphérique pour évaluer l'exposition des personnes en différents lieux (ce dernier point n'a finalement pas été traité faute de temps).

Pour répondre à ces questions, nous avons mené des expérimentations en conditions contrôlées (réacteur atmosphérique de laboratoire) ou semi-contrôlées (tunnel de terrain), en faisant varier les facteurs physiques les plus pertinents pour mieux comprendre et décrire ces processus. Notre étude s'est focalisée sur le mengovirus murin parfois considéré comme modèle de picornavirus, famille comprenant notamment le virus de l'hépatite A qui est l'un des 2 virus (avec les norovirus) les plus fréquemment mentionnés dans les épidémies d'origine alimentaire d'après le Codex Alimentarius. Les mesures ont concerné les virus (nombre de copies d'ARN viral et nombre de virus infectieux) d'une part, les variables environnementales susceptibles d'expliquer les tendances observées d'autre part.

L'aérosolisation des virus a été suivie sur de mini-placettes de sol nu, irriguées par des suspensions de mengovirus murin, puis couvertes par des tunnels permettant de contrôler la vitesse du vent, de suivre les conditions d'humidités et de températures de l'air et du sol, et de collecter les virus d'échantillons d'air prélevés en sortie des tunnels. Différents contextes ont été étudiés ; ils se distinguaient notamment par la vitesse du vent, l'origine de l'eau apportée, la température et l'humidité de la surface du sol. Deux types de biocollecteurs ont été utilisés et comparés : des impingers et des filtres. Un modèle a été proposé pour décrire l'aérosolisation d'un ou plusieurs pools de virus aérosolisables, chacun étant caractérisé par sa taille et par un coefficient cinétique d'aérosolisation. Nous l'avons utilisé d'une part pour évaluer la précision des estimations de taille de pool de virus aérosolisables et de coefficient d'aérosolisation associé, en générant des expériences numériques reproduisant la variabilité des mesures réelles et en ajustant à ces expériences numériques des simulations portant soit sur l'aérosolisation cumulée soit sur l'aérosolisation « instantanée » ; nous l'avons utilisé d'autre part pour ajuster les simulations aux observations expérimentales.

L'inactivation des virus a nécessité la mise au point d'un dispositif original permettant d'exposer les virus à différentes conditions atmosphériques : rayonnement (obscurité ou rayonnement d'intensité égale approximativement à 1/50^{ème} de celle du rayonnement solaire), humidité relative de l'air (30 à 80 %), température (15 à 40°C), et pouvoir oxydant de l'air (sans ou avec 300 ppb d'O₃ en entrée de réacteur). Les virus étaient déposés dans des tubes en polypropylène placés dans le réacteur. Un modèle de dépendance du coefficient d'inactivation des virus à l'humidité relative de l'air a été proposé. Pour disposer de plus de données, nous avons retraité des données de la littérature correspondant à des suivis d'inactivation de virus en suspension dans des réacteurs fermés.

Concernant l'aérosolisation, au niveau méthodologique, nous avons comparé, pour un pool unique de virus, différentes méthodes d'évaluation de la taille du pool et de son coefficient cinétique d'aérosolisation'. Nous avons montré que les paramètres caractérisant le pool de virus aérosolisables sont estimés de façon plus précise à partir de l'aérosolisation « instantanée ». Avec nos protocoles

expérimentaux et en absence de biais sur les données expérimentales, la taille réelle du pool de virus aérosolisés $N_{v-m}(t=0)$ (gc) est comprise entre plus de la moitié et moins de 2 fois la valeur estimée ; de la même façon, le coefficient cinétique d'aérosolisation réel k_a est comprise entre 0.7 et 1.4 fois sa valeur estimée. Les Impingers AGI-4 que nous avons utilisés (comme tous les autres biocollecteurs) ajoutent des biais aux incertitudes précédemment évoquées (biais beaucoup plus faibles qu'avec les filtres) : ils résultent d'une efficacité de piégeage des virus inférieure à 1 et d'une ré-aérosolisation partielle des virus préalablement piégés. Nos données pour qualifier les Impingers sont imprécises : nous avons estimé grossièrement que 77 % des virus traversant la solution de piégeage d'un Impinger y étaient piégés et que 11% des virus préalablement piégés étaient ré-aérosolisés pour 1 h de barbotage d'air avec un débit d'environ 4 L.min⁻¹. En se basant sur ces valeurs, nous avons décrit l'évolution de la concentration en virus piégés dans un Impinger au cours du temps pour un flux d'air ayant une charge constante en virus. Rapportée à l'évolution de la concentration en virus en situation de piégeage total, nous avons ainsi défini un facteur de correction, fonction de la durée d'accumulation des virus dans l'Impinger, nous permettant de corriger les données expérimentales. L'ajustement pratiqué sur les données ainsi corrigées amène à une valeur de $N_{v-m}(t=0)$ égale à environ 2 fois sa valeur estimée sans cette correction ; elle amène à peu de changement sur la valeur estimée de k_a . En tenant compte simultanément des incertitudes et des biais, la valeur réelle de $N_{v-m}(t=0)$ serait alors comprise entre sa valeur estimée et 4 fois cette valeur. Potentiellement, une des limites à ce type d'approche est l'existence de plusieurs pools ayant chacun leurs paramètres ($N_{v-m}(t=0)$ et k_a). L'expérience semble nous dire que la distinction de 2 pools semble suffisante : un pool aérosolisé « instantanément » et un pool aérosolisé sur un mode cinétique. Toutefois, cette hypothèse méritera d'être reprise dans des travaux ultérieurs. Nous avons ainsi montré que des virus apportés au sol par irrigation peuvent être ultérieurement mis en suspension dans l'atmosphère ; à notre connaissance, c'est la première fois qu'un tel résultat est montré. Les expériences sous tunnels ventilés montrent qu'entre 1 et 10% des virus apportés peuvent être remobilisés si l'on ne tient pas compte du facteur de correction évoqué précédemment ($\times 2$). On distingue un pool de virus aérosolisés quasi-instantanément et dont la taille ajustée correspond grossièrement aux virus aérosolisés durant les 30 premières minutes des suivis (environ 1/3 des virus aérosolisés pendant la durée de chacune des expériences). Si l'on s'intéresse aux virus aérosolisés sur un mode cinétique, leur nombre $N_{v-m}(t=0)$ (en gc) semble pouvoir être très bien estimé en tenant compte de la vitesse du vent (fonction carrée), de la température (fonction exponentielle décrivant probablement l'effet de la température sur les forces de type hydrophile/hydrophobe) et de la nature de l'eau, l'eau usée réduisant l'adsorption des virus à la surface des solides (compétition entre MO des eaux usées et virus pour cette adsorption). Les coefficients cinétiques d'aérosolisation k_a pour ce pool cinétique varient entre 0.007 (correspondant à 13 j pour aérosoliser 90% des virus aérosolisables) et 0.21 (correspondant à 11 h pour aérosoliser 90% des virus aérosolisables). L'ajustement simultané des simulations aux données des 7 expériences sous tunnel, en décrivant $N_{v-m}(t=0)$ par le même formalisme mathématique, faisant intervenir 3 paramètres, permet de refléter alors très bien les 7 expériences et de mieux mettre en évidence quelques données aberrantes dans les deux premières expériences.

Concernant l'inactivation, l'utilisation de supports en polypropylène semble avoir permis de récupérer tous les virus déposés initialement pour une extraction au PBS au 10^{ème} ; en absence d'O₃ et de rayonnement, les nombres de copies d'ARN viral extrait et dénombré après 4 h d'incubation sont compris entre 30 et 270 % de l'apport estimé. L'emploi du polypropylène ne permet malheureusement pas d'exclure un effet physique de ce support sur l'inactivation des virus, notamment aux humidités relatives de l'air où les forces au niveau des interfaces du système « air-virus-eau –polypropylène » pourraient être les plus importantes. A 25°C, la vitesse d'inactivation a augmenté avec la baisse de 80 %

à 30% de l'humidité relative de l'air. Aucune inactivation n'a été détectée à 15°C. Nous avons proposé un formalisme mathématique pour décrire la variation du coefficient d'inactivation k_i avec l'humidité relative de l'air. Il permet de simuler approximativement nos observations à 25°C, mais il prédit un abattement rapide de l'infectiosité à 15°C, alors que nos observations n'indiquent aucune évolution. Ce contraste suggère que certaines valeurs ou plages de températures jouent un rôle de seuil pour qu'un phénomène puisse se produire ; on peut penser notamment à la stabilité de la capsid qui dépend de forces de cohésion intermoléculaires réduites par l'agitation thermique. A 25°C, la valeur maximale trouvée du coefficient d'inactivation k_i est de 26 h⁻¹ ; elle correspondrait à un abattement de 3 log₁₀ en 16 min. Les coefficients d'inactivation calculés à partir des données publiées dans la littérature présentent, pour certains virus, le même type de dépendance à l'humidité relative de l'air avec des valeurs maximales toutefois plus faibles que la valeur que nous avons trouvée pour le mengovirus murin. Ils sont spécifiques à chaque virus ; pour certains, on peut avoir une dépendance à l'humidité très différente avec des maximums d'inactivation aux humidités fortes ou faibles.

Notre travail pourrait être amélioré, complété et poursuivi à différents points de vue. Concernant l'aérosolisation des virus, on peut envisager :

- des améliorations de méthodes : il s'agit de mieux décrire le fonctionnement des impingers avec le coefficient d'interception des virus qui doit être relié à la hauteur et à la composition du liquide de collecte, au débit du bullage imposé, voire à la présence d'obstacles au bullage, et le taux de virus ultérieurement remis en suspension dans l'air et expulsés des impingers qui doit être relié au bullage et à leur redéposition éventuelle sur les parois de l'impinger. On peut envisager de changer de modèle d'impinger, ou opter pour d'autres types de biocollecteurs. On peut notamment mentionner les biocollecteurs existants à impaction par précipitation électrostatique (Wéry et al., 2010), ou le prototype du CEA (LETI) qui permet un débit d'air de 100 L.min⁻¹ (Roux et al., 2013 ; Roux et al., 2012). On peut aussi mentionner les impacteurs en cascade permettant une séparation granulométrique des bioaérosols de type Andersen (Zhao et al., 2014 ; King et McFarland, 2012 ; Lee et al., 2011 ; Held et al., 2008) ; ils permettent une caractérisation *a posteriori* des bioaérosols (virus, voire phases solides porteuses), et l'agrégation des virus, la taille et la forme des particules inertes auxquelles ils peuvent adhérer sont des informations essentielles pour modéliser le transport des bioaérosols dans l'atmosphère (Holmes et Morawska, 2006) ; la nature chimique des particules peut éventuellement affecter l'inactivation des virus ;
- l'acquisition d'un grand nombre de résultats pour avoir un modèle ayant une valeur générique d'abord sur un sol donné, éventuellement progressivement en jouant sur plusieurs sols ;
- l'amélioration de la compréhension des processus en revisitant les pools à définir/retenir en fonction de leur spéciation dans l'air (virus isolés, virus adsorbés à la surface de colloïdes inertes eux-mêmes aérosolisés et éventuellement distinction de pools suivant la nature de ces colloïdes ...), voire en fonction de leur spéciation en surface du sol. Ce dernier point suppose de pouvoir « extraire » par des méthodes douces les virus à la surface du sol. Des techniques de lavage doux peuvent être envisagées ; nous avons voulu utiliser une méthode de lavage proche de celle proposée par Hattori (1988) pour caractériser les microorganismes à la surface d'agrégats ; malheureusement, la stabilité structurale du sol s'est avérée insuffisante pour conserver la structure des agrégats et mottes prélevés en surface ;

Concernant l'inactivation, on peut envisager :

- le réacteur atmosphérique de laboratoire (architecture d'ensemble et pilotage) pourrait être modifié pour permettre un prélèvement d'échantillons moins perturbateur de l'atmosphère du

réacteur, un éclairage modulable en intensité et un dosage des concentrations en O₃ possible au débit de balayage du réacteur ;

- l'amélioration des procédures pour avoir une meilleure maîtrise de la disparition initiale de l'eau des gouttelettes de suspension virale et pour réduire les perturbations d'humidité relative de l'air à chaque ouverture du réacteur ;
- l'amélioration de la compréhension des processus sous-jacents à l'effet de la température, dont notamment un effet sur la cohésion entre protéines constitutives de la capsid ;
- un travail sur les données obtenues sur supports publiés dans littérature.

Notre étude de l'aérosolisation de virus n'a considéré que des situations de sol nu ; elle s'est restreinte à un sol dont la faible stabilité structurale a interdit l'obtention de rugosités de surface très contrastées. Il est évident que le travail du sol et sa composition (texture, minéralogie, matière organique) sont autant de facteurs à considérer. De même, le travail doit être étendu à des surfaces couvertes par une végétation ; cette dernière influe la déposition initiale des virus lors de l'irrigation et leur remise en suspension au cours d'épisodes venteux ultérieurs. L'inactivation a été suivie pour un nombre très limité de conditions atmosphériques, sans considérer des supports correspondant aux colloïdes pouvant être aérosolisés avec des virus attachés à leur surface, et sans aucune comparaison au niveau infectiosité entre le virus de l'hépatite A et le mengovirus murin considéré comme son modèle.

Avec quelques compléments (notamment ceux qui viennent d'être évoqués), notre travail devrait permettre une modélisation couplant aérosolisation, inactivation et transferts atmosphériques de virus, pour en définitive alimenter les modèles d'évaluation quantitative des risques microbiens concernant les contaminations par voie aérienne.

L'analyse quantitative des risques microbiens qui doit découler de ce type d'approche pourrait éclairer les décisions en matière de réglementations et de normes relatives à la réutilisation des eaux usées en irrigation, comme l'Organisation Mondiale de la Santé le suggérait ([WHO, 2006](#)). La mise en place de nouvelles réglementations et normes amène à évoquer 2 enjeux : l'identification de bio-indicateurs mieux corrélés aux virus entériques de l'homme, et la mise en place de nouvelles méthodes de suivi des virus dans l'environnement de mise en œuvre aisée et de coût raisonnable.

Bibliographie globale

- Abad, F. X., Villena, C., Guix, S., Caballero, S., Pintó, R. M., et Bosch, A. 2001. Potential role of fomites in the vehicular transmission of human astroviruses. *Applied and Environmental Microbiology*, 67(9), 3904-3907.
- Abad, F. X., Pinto, R. M., et Bosch, A. 1994. Survival of enteric viruses on environmental fomites. *Applied and Environmental Microbiology*, 60(10), 3704-3710.
- Adams, D.J., Spendlove, J.C., Spendlove, R.S., Barnett, B.B., 1982. Aerosol stability of infectious and potentially infectious reovirus particles. *Appl. Environ. Microbiol.* 44, 903 –908.
- AFD. 2011. La réutilisation des eaux usées traitées (REUT). Eléments de méthodologie pour l’instruction de projets. Agence Française de Développement. VF26.
- AFSSA. 2008. Réutilisation des eaux usées traitées pour l’arrosage ou l’irrigation. 2001-SA-0075.
- Albinana-Gimenez, N., ClementeCasares P., Bofill-Mas S., Hundesa A., Ribas F., et Girones R.. 2006. Distribution of Human Polyoma- viruses, Adenoviruses, and Hepatitis E Virus in the Environment and in a Drinking-Water Treatment Plant. *Env. Sci Technol.* Vol. 40, n°23, p. 7416-7422.
- Altmeyer, N., Abadia G., Schmitt S., et Leprince A.. 1990. Risques microbiologiques et travail dans les stations d’épuration des eaux usées. Doc. Pour Médecin Trav. n°44.
- Angelakis, A.N. 2012. Wastewater recycling and reuse in EU countries: necessity for Establishing EU Legislation. Workshop on the Quality of Recycled Water and its Application in Agriculture 27th. Dans : Cyprus Board of Limassol-Amathus (SBLA).
- Angelakis, A.N., et Durham B.. 2008. Water recycling and reuse in EUREAU countries: Trends and challenges. *Desalination.* Vol. 218, n°1-3, p. 3-12.
- Akers, T. G., Prato, C. M., et Dubovi, E. J. 1973. Airborne stability of simian virus 40. *Applied microbiology*, 26(2), 146-148.
- Akers, T.G., Hatch, M.T., 1968. Survival of a picornavirus and its infectious ribonucleic acid after aerosolization. *Appl. Microbiol.* 16, 1811–1813.
- Akers, T.G., Bond, S., Goldberg, L.J., 1966. Effect of Temperature and Relative Humidity on Survival of Airborne Columbia SK Group Viruses. *Appl. Microbiol.* 14, 361–364.
- Asano T. 1998. Wastewater reclamation and reuse. *Water Quality Management Series* Volume 10, CRC Press, Boca Raton, FL, USA.
- Ausar, S. F., Foubert, T. R., Hudson, M. H., Vedvick, T. S., et Middaugh, C. R. 2006. Conformational stability and disassembly of Norwalk virus-like particles effect of pH and temperature. *Journal of Biological Chemistry*, 281(28), 19478-19488.
- Aussel, H., Le Bâcle C., et Dornier G.. 2004. Le point des connaissances sur le traitement des eaux usées. INRS.
- Bae, S. C., Park, S. Y., Kim, A. N., Oh, M. H., et Ha, S. D. 2014. Survival of hepatitis A virus on various food-contact surfaces during 28days of storage at room temperature. *Food Research International*, 64, 849-854.
- Barakat, M.A., et Schmidt E.. 2010. Polymer-enhanced ultrafiltration process for heavy metals removal from industrial wastewater. *Desalination.* Vol. 256, n°1-3, p. 90-93.
- Barron, A.L., Olshevsky C., et M.M. Cohen. 1970. Characteristics of the BGM line of cells from African green monkey kidney. *Arch. Für Gesamte Virusforsch.* Vol. 32, n°4, p. 389-392.
- Bates B.C., Kundzewicz Z.W., Wu S., Palutikof J.P. 2008. Climate Change and Water. *Technical Paper of the Intergovernmental Panel on Climate Change*, IPCC Secretariat, Geneva, 210 pp.
- Baudart, J., et Paniel N. 2014. Sources et devenir des micro-organismes pathogènes dans les environnements aquatiques. *Rev. Francoph. Lab.* Vol. 2014, n°459, p. 29-39.
- Bauer, H., Fuerhacker M., Zibuschka F., Schmid H., et Puxbaum H. 2002. Bacteria and fungi in aerosols generated by two different types of wastewater treatment plants. *Water Res.* Vol. 36, n°16, p. 3965-3970.

- Baumont, S. 2002. Réutilisation des eaux usées épurées : risques sanitaires et faisabilités en île de France. Observatoire régional de santé île de France Institut d'aménagement et d'urbanisme de la région ILF.
- Baumont, S., Camard J.P., A. Lefranc, et A. Franconi. 2004. Réutilisation des eaux usées épurées : risques sanitaires et faisabilité en Île-de-France.
- Bausum, H.T., Schaub, S. A., Kenyon, K. F., et Small, M. J. 1982. Comparison of coliphage and bacterial aerosols at a wastewater spray irrigation site. *Applied and environmental microbiology*, 43(1), 28-38.
- Bedos C., Rousseau-Djabri M.F., Flura D., Masson S., Barriuso E., Cellier, P. 2002. Rate of pesticide volatilization from soil: an experimental approach with a wind tunnel system applied to trifluralin. *Atmospheric Environment* 36, 5917-5925.
- Bertrand, I., Schijven J. F., Sánchez G., Wyn-Jones P., Ottoson J., Morin T., Muscillo M., Verani M., Nasser A., de Roda Husman A. M., Myrmel M., Sellwood J., Cook N., et Gantzer C.. 2012. The impact of temperature on the inactivation of enteric viruses in food and water: a review. *J.Appl. Microbiol.*
- Bitton, G. 2005. *Wastewater microbiology*. John Wiley & Sons.
- Bixio, D., Thoeue C., J. De Koning, D. Joksimovic, D. Savic, T. Wintgens, et T. Melin. 2006. Wastewater reuse in Europe. *Desalination*. Vol. 187, n°1-3, p. 89-101.
- Bixio, D., Thoeue C., Wintgens T., Ravazzini A., Miska V., Muston M., Chikurel H., Aharoni A., Joksimovic D., et Melin T.. 2008. Water reclamation and reuse: implementation and management issues . *Desalination*. Vol. 218, n°1-3, p. 13-23.
- Blaine Hollinger F, Emerson U.S. 2007. Hepatitis A VirusFields virology, 5th ed. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams et Wilkins, Philadelphia.
- Blatny, J. Martha, Reif B A P., Skogan G., Andreassen O., Arne Høiby E., Ask E., Waagen V., Aanonsen D., Aaberge I.S., et. Caugant D.A. 2008. Tracking airborne Legionella and Legionella pneumophila at a biological treatment plant. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 42, n°19, p. 7360-7367.
- Bofill-Mas S., Albinana-Gimenez N., Clemente-Casares P., Hundesa A., Rodriguez-Manzano J., Allard A., Calvo M., Girones R. 2006. Quantification and Stability of Human Adenoviruses and Polyomavirus JCPyV in Wastewater Matrices. *Applied and Environmental Microbiology* 72:7894-7896.
- Boone, S. A., et Gerba, C. P. 2007. Significance of fomites in the spread of respiratory and enteric viral disease. *Applied and Environmental Microbiology*, 73(6), 1687-1696.
- Brissaud F. 2003. Groundwater recharge with recycled municipal wastewater: criteria for health related guidelines. State of the art report health risks in aquifer recharge using reclaimed water Water, Sanitation and Health Protection and the Human Environment World Health Organization Geneva and WHO Regional Office for Europe Copenhagen, Denmark 2:10-15.
- Brooks, J.P., Tanner, B. D., Gerba, C. P., Haas, C. N., & Pepper, I. L. 2005. Estimation of bioaerosol risk of infection to residents adjacent to a land applied biosolids site using an empirically derived transport model. *Journal of applied microbiology*, 98(2), 397-405.
- Brown, A., et Matlock M.D.. 2011. A review of water scarcity indices and methodologies. Sustain. Consort. White Pap. n°106, p. 19.
- Burrows, S. M., Elbert W., Lawrence M.G., et Pöschl U. 2009. Bacteria in the global atmosphere – Part 1: Review and synthesis of literature data for different ecosystems. *Atmospheric Chem. Phys.* Vol. 9, n°23, p. 9263-9280.
- Burton, N. C., Grinshpun, S. A., et Reponen, T. 2007. Physical collection efficiency of filter materials for bacteria and viruses. *Annals of Occupational Hygiene*, 51(2), 143-151.
- Butot, S., Putallaz, T., Amoroso, R., et Sanchez, G. 2009. Inactivation of enteric viruses in minimally processed berries and herbs. *Applied and environmental microbiology*, 75(12), 4155-4161.
- Cao, H., Tsai, F.T.C., et Rusch, K. A. 2010. Salinity and soluble organic matter on virus sorption in sand and soil columns. *Groundwater*, 48(1), 42-52.
- CAC/GL 79-2012. Guidelines on the application of general principles of food hygiene to the control of viruses in food. Codex alimentarius. International Food Standards.

- Cannon, J. L., Kotwal, G., et Wang, Q. (2013). Inactivation of Norovirus Surrogates after Exposure to Atmospheric Ozone. *Ozone: Science & Engineering*, 35(3), 217-219.
- Carducci, A., Battistini, R., Rovini, E., et Verani, M. 2009. Viral removal by wastewater treatment: monitoring of indicators and pathogens. *Food and Environmental Virology*, 1(2), 85-91.
- Carducci, A., Tozzi E., Rubulotta E., Casini B., Cantiani L., Rovini E., Muscillo M., et Pacini R.. 2000. Assessing airborne biological hazard from urban wastewater treatment. *Water Res.* Vol. 34, n°4, p. 1173-1178.
- Carducci A., Arrighi S., Ruschi A. 1995. Detection of coliphages and enteroviruses in sewage and aerosol from an activated sludge wastewater treatment plant. *Letters in Applied Microbiology* 21, 207-209.
- Casal, J., Planas-Cuchí E., Moreso J.M., et Casal J.. 1995. Forecasting virus atmospheric dispersion. Studies with foot-and-mouth disease. *J. Hazard. Mater.* Vol. 43, n°3, p. 229-244.
- Casanova, L. M., Jeon, S., Rutala, W. A., Weber, D. J., et Sobsey, M. D. 2010. Effects of air temperature and relative humidity on coronavirus survival on surfaces. *Applied and environmental microbiology*, 76(9), 2712-2717.
- Chancellor D.D., Tyagi S., Bazaco M.C., Bacvinskas S., Chancellor M.B., Dato V.M., de Miguel F. 2006. Green onions: potential mechanism for hepatitis A contamination. *Journal of Food Protection* 69, 1468-1472.
- Chigor, V. N., et Okoh A.I. 2012. Quantitative RT-PCR detection of hepatitis A virus, rotaviruses and enteroviruses in the Buffalo River and source water dams in the Eastern Cape Province of South Africa. *International journal of environmental research and public health*, 9(11), 4017-4032.
- Coakley, SM, et Scherm H. 1996. Plant disease in a changing global environment. *Asp. Appl. Biol.*
- Cook, N., et D'Agostino, M. 2013. Prevalence and control of hepatitis A virus in fresh produce. *Food Borne Viruses and Prions and Their Significance for Public Health*, 169.
- Costafreda M.I., Bosch A., Pintó R.M. 2006. Development, evaluation, and standardization of a real-time TaqMan reverse transcription-PCR assay for quantification of hepatitis A virus in clinical and shellfish samples. *Applied and Environmental Microbiology* 71, 804-810.
- Craun G.F., Brunkard J.M., Yoder J.S., Roberts V.A., Carpenter J., Wade T., Calderon R.L., Roberts J.M., Beach M.J., Roy S.L. 2010. Causes of outbreaks associated with drinking water in the United States from 1971 to 2006. *Clinical Microbiology Reviews* 23, 507-528.
- CSHPF. 1991. Recommandations du Conseil Supérieur d'Hygiène publique de France relatives à l'utilisation des eaux usées épurées pour l'irrigation des cultures et l'arrosage des espaces verts. Conseil Supérieur d'Hygiène publique de France.
- Cuthbert, J.A. 2001. Hepatitis A: old and new . *Clin. Microbiol. Rev.* Vol. 14, n°1, p. 38-58.
- Dart A., Thornburg J. 2008. Collection efficiencies of bioaerosol impingers for virus-containing aerosols. *Atmospheric Environment* 42, 828-832.
- Da Silva A.R, Kavanagh O.V., Estes M.K., Elimelech M. 2011. Adsorption and aggregation properties of Norovirus GI and GII virus-like particles demonstrate differing responses to solution chemistry. *Environmental Science & Technology* 45, 520-526.
- Deboosere, N., Pinon A., Caudrelier Y., Delobel A., Merle G., Perelle S., Temmam S., Loutreul J., Morin T., Estienney M., Belliot G., Pothier P., Gantzer C., et Vialette M.. 2012. Adhesion of human pathogenic enteric viruses and surrogate viruses to inert and vegetal food surfaces. *Food Microbiol.*
- De Jong, J. C., et Winkler, K.C. 1968. The inactivation of poliovirus in aerosols. *Journal of Hygiene*, 66(04), 557-565.
- De Mik, G., de Groot, I., et Gerbrandy, J.L.F. 1977. Survival of aerosolized bacteriophage ϕ X174 in air containing ozone-olefin mixtures. *Journal of Hygiene*, 78(02), 189-198.
- DiCaprio E., Culbertson D., Li J. 2015. Evidence of the internalization of animal caliciviruses via the root of growing strawberry plants and dissemination to the fruit. *Applied and Environmental Microbiology*, AEM-03867.
- DiCaprio E., Ma Y., Purgianto A., Hughes J., Li J. 2012. Internalization and dissemination of human norovirus and animal caliciviruses in hydroponically grown romaine lettuce. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 6143-6152.

- Douttree, J.C., Druce, J.D., Birch, C. J., Bowden, D. S., et Marshall, J. A. 1999. Inactivation of feline calicivirus, a Norwalk virus surrogate. *Journal of Hospital Infection*, 41(1), 51-57.
- Drechsel P., et Evans A.E.V. 2010. Wastewater use in irrigated agriculture. *Irrig. Drain. Syst.* Vol. 24, n°1-2, p. 1-3.
- D'Souza D. H., Sair, A., Williams, K., Papafragkou, E., Jean, J., Moore, C., et Jaykus, L. 2006. Persistence of caliciviruses on environmental surfaces and their transfer to food. *International journal of food microbiology*, 108(1), 84-91.
- Duizer E., Bijkerk P., Rockx B., de Groot A., Twisk F., et Koopmans M.. 2004. Inactivation of Caliciviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 70, n°8, p. 4538-4543.
- Dungan R.S. 2014. Estimation of infectious risks in residential populations exposed to airborne pathogens during center pivot irrigation of dairy wastewaters. *Environmental Science & Technology* 48, 5033-504
- Dungan R.S. 2010. BOARD-INVITED REVIEW: Fate and transport of bioaerosols associated with livestock operations and manures. *J. Anim. Sci.* Vol. 88, n°11, p. 3693 -3706.
- Du Pisani P.L. 2006. Direct reclamation of potable water at Windhoek's Goreangab reclamation plant . *Desalination*. Vol. 188, n°1-3, p. 79-88.
- Dupont S., Brunet Y., et Jarosz N.. 2006. Eulerian modelling of pollen dispersal over heterogeneous vegetation canopies. *Agric. For. Meteorol.* Vol. 141, n°2-4, p. 82-104.
- El Zanati O. 2011. Rétention et restitution d'un Mengovirus murin, utilisé comme substitut du virus de l'hépatite A, dans un modèle de colonne de sol en fonction de la granulométrie des agrégats et propriétés physicochimiques de la solution circulante. *Mémoire de Master 2, Université d'Avignon et des Pays de Vaucluse*.
- Ensink J.H.J., van der Hoek W. 2006. Raw wastewater use in agriculture; risk versus benefits. In *Health Impact Assessment for Sustainable Water Management Edited by Lorna Fewtrell and David Kay*. Published by IWA Publishing, London, UK, Chapter 10, pp. 233-248.
- FAO et OAA. 2011. The state of the world's land and water resources for food and agriculture: managing systems at risk. 1st ed. Milton Park, Abingdon ; New York, NY : Earthscan, 285 p. ISBN : 184971326X.
- Flannery J., Keaveney S., Rajko-Nenow, P., O'Flaherty V., et Doré W. 2012. Concentration of norovirus during wastewater treatment and its impact on oyster contamination. *Applied and environmental microbiology*, 78(9), 3400-3406.
- Fracchia L., Pietronave S., Rinaldi M., Martinotti M.G. 2006. Site-related airborne biological hazard and seasonal variations in two wastewater treatment plants. *Water Research* 40, 1985-1994.
- Fujioka, R.S, et B.S. Yoneyama. 2002. Sunlight inactivation of human enteric viruses and fecal bacteria. *Water Sci. Technol. J. Int. Assoc. Water Pollut. Res.* Vol. 46, n°11-12, p. 291-295.
- Fujioka R., Kurtz H., et Ackermann W.W. 1969. Effects of Cations and Organic Compounds on Inactivation of Poliovirus with Urea, Guanidine, and Heat. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* Vol. 132, n°3, p. 825-829.
- Gantzer C, Dubois É., Crance J-M., Billaudel S., Kopecka H., Schwartzbrod L., Pommepuy M., Guyader FL. 1998. Devenir des virus entériques en mer et influence des facteurs environnementaux. *Oceanologica Acta* 21:983-992.
- Genetet, N. 2002. Immunologie. Londres; Paris; New York (N.Y.); Cachan : Tec & Doc ; Éd. médicales internationales, ISBN : 2743005289 9782743005283.
- Gerba, C.P, et Smith J.E Jr. 2005. Sources of pathogenic microorganisms and their fate during land application of wastes. *J. Environ. Qual.* Vol. 34, n°1, p. 42-48.
- Gerba C.P., Gramos D.M., et Nwachuku N. 2002. Comparative Inactivation of Enteroviruses and Adenovirus 2 by UV Light. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 68, n°10, p. 5167-5169.
- Giungato P., Nardone E., Notarnicola L. 2010. Reclamation of treated wastewater in the Apulia región (Italy): state of the art and future perspectives. *J. Commodity Sci. Technol. Quality* 49, 105-120.
- Girard M., Ngazoa S., Mattison K., et Jean J. 2010. Attachment of noroviruses to stainless steel and their inactivation, using household disinfectants. *Journal of Food Protection®*, 73(2), 400-404.

- Goldstein R.E.R., Micallef S.A., Gibbs S.G., He X., George A., Sapkota A., Joseph S.W., Sapkota A.R. 2014. Occupational exposure to *Staphylococcus aureus* and *Enterococcus* spp. among spray irrigation workers using reclaimed water. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 11, 4340-4355.
- Grinshpun S.A., Willeke K., Ulevicius V., Juozaitis A., Terzieva S., Donnelly J., Stelma G.N., Brenner K.P. 1997. Effect of Impaction, Bounce and Reaerosolization on the Collection Efficiency of Impingers. *Aerosol Science and Technology* 26, 326-42.
- Grisoli P., Rodolfi M., Villani S., Grignani E., Cottica D., Berri A., Picco A.M., et Dacarro C. 2009. Assessment of airborne microorganism contamination in an industrial area characterized by an open composting facility and a wastewater treatment plant. *Environ. Res.* Vol. 109, n°2, p. 135-142.
- Han T., Mainelis G. 2012. Investigation of inherent and latent internal losses in liquid-based bioaerosol samplers. *Journal of Aerosol Science* 45, 58-68.
- Hanafiah K.M., Jacobsen K.H., et Wiersma S.T.. 2011. Challenges to mapping the health risk of hepatitis A virus infection. *Int. J. Health Geogr.* Vol. 10, n°1, p. 57.
- Harper, D.R. 2012. Viruses: biology, applications, control. New York : Garland Science, 324 p. ISBN : 9780815341505.
- Harstad, J. B. 1965. Sampling submicron T1 bacteriophage aerosols. *Applied microbiology*, 13(6), 899-908.
- Hattori, T. 1988. Soil aggregates as microhabitats of microorganisms. Tohoku University.
- Henningson E.W., Ahlberg M.S. 1994. Evaluation of Microbiological Aerosol Samplers: A Review. *Journal of Aerosol Science* 25, 1459-92. doi:10.1016/0021-8502(94)90219-4.
- Heinonen-Tanski, H., Reponen T., et Koivunen J. 2009. Airborne enteric coliphages and bacteria in sewage treatment plants. *Water Res.* Vol. 43, n°9, p. 2558-2566.
- Held A., Zerrath A., Mckee U., T. Fehrenbach, Niessner R., Plassdülmer C., Kaminski U., Berresheim H., et Poschl U. 2008. Aerosol size distributions measured in urban, rural and high-alpine air with an electrical low pressure impactor (ELPI). *Atmos. Environ.* Vol. 42, n°36, p. 8502-8512.
- Hirneisen K. A., et Kniel K.E. 2013. Norovirus surrogate survival on spinach during preharvest growth. *Phytopathology*, 103(4), 389-394.
- Herbold K., Flehmig B., et Botzenhart K.. 1989. Comparison of ozone inactivation, in flowing water, of hepatitis A virus, poliovirus 1, and indicator organisms. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 55, n°11, p. 2949 -2953.
- Hermann J.R., Hoff S.J., Yoon K.J., Burkhardt A.C., Evans R.B., Zimmerman J.J. 2006. Optimization of a sampling system for recovery and detection of airborne porcine reproductive and respiratory syndrome virus and swine influenza virus. *Applied and Environmental Microbiology* 72, 4811-4818.
- Hewitt J., M. Leonard, G.E. Greening, et G.D. Lewis. 2011. Influence of wastewater treatment process and the population size on human virus profiles in wastewater. *Water Res.* Vol. 45, n°18, p. 6267-6276.
- Hirneisen K.A., Kniel K.E. 2013. Comparative uptake of enteric viruses into spinach and green onions. *Food and Environmental Virology* 5, 24-34.
- Hoffman R., Marshall M.M., Gibson M.C., et. Rochelle P.A. 2009. Prioritizing Pathogens for Potential Future Regulation in Drinking Water. *Env. Sci Technol.* Vol. 43, n°14, p. 5165-5170.
- Holmes N.S., et Morawska L. 2006. A review of dispersion modelling and its application to the dispersion of particles: An overview of different dispersion models available. *Atmos. Environ.* Vol. 40, n°30, p. 5902 -5928.
- Hollinger B.F., et Emerson S.U. 2007. Hepatitis A Virus . Dans : Fields Virol. Philadelphia : Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins.
- Holmes, N.S., et Morawska L. 2006. A review of dispersion modelling and its application to the dispersion of particles: An overview of different dispersion models available. *Atmos. Environ.* Vol. 40, n°30, p. 5902 -5928.
- Hogan C.J., Kettleson E.M., Lee M.H., Ramaswami B., Angenent L.T., Biswas P. 2005. Sampling methodologies and dosage assessment techniques for submicrometre and ultrafine virus aerosol particles. *Journal of Applied Microbiology* 99, 1422-1434.

- Iglesias R., Ortega E., Batanero G., et Quintas L. 2010. Water reuse in Spain: Data overview and costs estimation of suitable treatment trains . *Desalination*. Vol. 263, n°1-3, p. 1-10.
- Ijaz M. K., Brunner A. H., Sattar S.A., Nair, R.C., et Johnson-Lussenburg, C.M. 1985a. Survival characteristics of airborne human coronavirus 229E. *Journal of General Virology*, 66(12), 2743-2748.
- Ijaz M.K., Sattar S.A., Johnson-Lussenburg C.M., Springthorpe V.S., 1985b. Comparison of the airborne survival of calf rotavirus and poliovirus type 1 (Sabin) aerosolized as a mixture. *Appl. Environ. Microbiol.* 49, 289–293.
- IPCC. 2013. Summary for Policymakers . Dans : Clim. Change 2013 Phys. Sci. Basis Contrib. Work. Group Fifth Assess. Rep. Intergov. *Panel Clim. Change*. p. 33. ISBN : 9781107661820.
- Jacobsen K.H., et S.T. Wiersma. 2010. Hepatitis A virus seroprevalence by age and world region, 1990 and 2005. *Vaccine*. Vol. 28, n°41, p. 6653-6657.
- Jean, J., Morales-Rayas R., Anoman M.N., et Lamhoujeb S. 2011. Inactivation of hepatitis A virus and Norovirus surrogate in suspension and on food-contact surfaces using pulsed UV light (pulsed light inactivation of food-borne viruses). *Food Microbiol.* Vol. 28, n°3, p. 568-572.
- Jensen, M.M. 1964. Inactivation of airborne viruses by ultraviolet irradiation. *Applied microbiology*, 12(5), 418-420.
- Jiménez B., Drechsel P., Koné D., Bahri A., Raschid-Sally L., Qadir M. 2010. Wastewater, sludge and excreta use in developing countries: an overview. In: *Wastewater Irrigation and Health Assessing and Mitigating Risk in Low-Income Countries* (Drechsel P., Scott C.A., Raschid-Sally L., Redwood M., Bahri A. eds.), 3-27.
- Jiménez-Cisneros, B., et A. Chávez-Mejía. 1997. Treatment of Mexico City Wastewater for Irrigation Purposes. *Environ. Technol.* Vol. 18, n°7, p. 721-729.
- Jones, A. M., et Harrison, R. M. 2004. The effects of meteorological factors on atmospheric bioaerosol concentrations—a review. *Science of the Total Environment*, 326(1), 151-180.
- JORF. 2012. Arrêté du 2 août 2010 relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts. AFSP1410752A.
- . 2014. Arrêté du 25 juin 2014 modifiant l'arrêté du 2 août 2010 relatif à l'utilisation d'eaux issues du traitement d'épuration des eaux résiduaires urbaines pour l'irrigation de cultures ou d'espaces verts. 0153AFSP1410752A.
- Kamel A.H., Ali. M.A., El-Nady H.G., Deraz A., Aho S., Pothier P., et Belliot G. 2011. Presence of enteric hepatitis viruses in the sewage and population of Greater Cairo: Research Notes. *Clin. Microbiol. Infect.* Vol. 17, n°8, p. 1182-1185.
- Katzenelson, E., et Kedmi S. 1979. Unsuitability of polioviruses as indicators of virological quality of water. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 37, n°2, p. 343-344.
- Katzenelson, E., et Teltch, B. 1976. Dispersion of enteric bacteria by spray irrigation. *Water Pollution Control Federation*, 710-716.
- Kennedy C., Baker L., Dhakal S., Ramaswami A. 2012. Sustainable urban systems: an integrated approach. *Journal of Industrial Ecology* 16, 775-779.
- Keraita B., Jiménez B., Drechsel P. 2008. Extent and implications of agricultural reuse of untreated, partly treated and diluted wastewater in developing countries. *CAB reviews: Perspectives in agriculture, veterinary science, nutrition and natural resources* 3, 1-15.
- Khuder S. A., Arthur T., Bisesi M. S., et Schaub, E.A. 1998. Prevalence of infectious diseases and associated symptoms in wastewater treatment workers. *American journal of industrial medicine*, 33(6), 571-577.
- Kim S. J., Si J., Lee J.E., et Ko, G. 2012 Temperature and humidity influences on inactivation kinetics of enteric viruses on surfaces. *Environmental science & technology*, 46(24), 13303-13310.
- Kim S.W., Ramakrishnan M.A., Raynor P.C., Goyal S.M., 2007. Effects of humidity and other factors on the generation and sampling of a coronavirus aerosol. *Aerobiologia* 23, 239–248. doi:10.1007/s10453-007-9068-9

- King, M.D., et McFarland A.R.. 2012. Use of an Andersen Bioaerosol Sampler to Simultaneously Provide Culturable Particle and Culturable Organism Size Distributions. *Aerosol Sci. Technol.* Vol. 46, n°8, p. 852-861.
- Knipe D.M., et Howley P.M.. 2007. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, 1650 p. ISBN : 9780781760607.
- Koopmans M., Duizer E. 2004. Foodborne viruses: an emerging problem. *International Journal of Food Microbiology* 90, 23-41.
- Koopmans M., Bonsdorff C.-H., Vinjé J., Medici D., et Monroe S. 2002. Foodborne viruses. *FEMS Microbiol. Rev.* Vol. 26, n°2, p. 187-205.
- Kukavica-Ibrulj, I., Darveau A., Jean J., et Fliss I. 2004. Hepatitis A virus attachment to agri-food surfaces using immunological, virological and thermodynamic assays. *Journal of applied microbiology*, 97(5), 923-934.
- La Rosa G., Marta F., Libera S.D., Iaconelli M., et Muscillo M.. 2013. Viral infections acquired indoors through airborne, droplet or contact transmission. *Ann. Dell'Istituto Super. Sanità*.
- La Rosa G., Pourshaban M., Iaconelli M., Muscillo M. 2010. Quantitative real-time PCR of enteric viruses in influent and effluent samples from wastewater treatment plants in Italy. *Annali del l'Istituto superiore di sanità* 46, 266-273.
- La Scola B., Desnues C., Pagnier I., Robert C., Barrassi L., Fournous G., Merchat M., Suzan-Monti M., Forterre P., Koonin E., et Raoult D.. 2008. The virophage as a unique parasite of the giant mimivirus. *Nature*. Vol. 455, n°7209, p. 100-104.
- Layshock J.A., Pearson B., Crockett K., Brown M.J., Van Cuyk S., Daniel W.B., Omberg K.M. 2012. Reaerosolization of *Bacillus* spp. in outdoor environments: a review of the experimental literature. *Biosecurity and Bioterrorism: Biodefense Strategy, Practice, and Science* 10, 299-303.
- Lazarova V., Liechti P.A., Savoye P., et Hausler R. 2013. Ozone disinfection: main parameters for process design in wastewater treatment and reuse. *J. Water Reuse Desalination*. Vol. 3, n°4, p. 337.
- Lazarova V., et Brissaud F. 2007. Intérêt, bénéfices et contraintes de la réutilisation des eaux usées en France. *EAU Ind. Nuis.* n°299, p. 23-39.
- Lazarova V. 2004. Wastewater treatment for water recycling. In *"Water Reuse for Irrigation ; Agriculture, Landscapes, and Turf Grass"* (V. Lazarova, A. Bahri Eds.) CRC Press, Boca Raton, Florida, 163-234.
- Le Cann, P., Ranarijaona S., Monpoeho S., Le Guyader F., et Ferré V. 2004. Quantification of human astroviruses in sewage using real-time RT-PCR. *Res. Microbiol.* Vol. 155, n°1, p. 11-15.
- Leckband D., et Israelachvili J. 2001. Intermolecular forces in biology. *Quarterly reviews of biophysics*, 34(02), 105-267.
- Lee I.S. 2011. Aerosol Particle Size Distribution and Genetic Characteristics of Aerosolized Influenza A H1N1 Virus Vaccine Particles. *Aerosol Air Qual. Res.*
- Le Guyader F.S., Ollivier J.J, Le Saux J.C, et Garry P. 2014. Les virus entériques humains et l'eau. *Rev. Francoph. Lab.* Vol. 2014, n°459, p. 41-49.
- Le Guyader FS, Atmar RL, Le Pendu J. 2012. Transmission of viruses through shellfish: when specific ligands come into play. *Curr Opin Virol* 2:103-110.
- Lente I., Keraita B., Drechsel P., Ofosu-Anim J., et Brimah A. K.. 2012. Risk Assessment of Heavy-Metal Contamination on Vegetables Grown in Long-Term Wastewater Irrigated Urban Farming Sites in Accra, Ghana . *Water Qual. Expo. Health*. Vol. 4, n°4, p. 179-186.
- Leverenz H.L., Tchobanoglous G., et Asano T. 2011. Direct potable reuse: a future imperative. *J. Water Reuse Desalination*. Vol. 1, n°1, p. 2.
- Li C.S. 1999. Evaluation of microbial samplers for bacterial microorganisms. *Aerosol Science & Technology*, 30(2), 100-108.
- Liu K., Wen Z., Li N., Yang W., Wang J., Hu L., Dong X., Lu J., Li J. 2012. Impact of Relative Humidity and Collection Media on Mycobacteriophage D29 Aerosol. *Applied and Environmental Microbiology* 78, 1466-72. doi:10.1128/AEM.06610-11.

- Lin Y.C., et Wu S.C.. 2006. Effects of ozone exposure on inactivation of intra- and extracellular enterovirus 71. *Antiviral Res.* Vol. 70, n°3, p. 147-153.
- Lin X., Willeke, K., Ulevicius, V., et Grinshpun, S. A. 1997. Effect of sampling time on the collection efficiency of all-glass impingers. *American Industrial Hygiene Association Journal*, 58(7), 480-488.
- Lockyer D.R. 1984. A system for the measurement in the field of losses of ammonia through volatilization. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 35, 837-848.
- Lodder W.J., Van Den Berg, H.H.J.L., Rutjes, S.A., et De Roda Husman, A.M. 2010. Presence of enteric viruses in source waters for drinking water production in The Netherlands. *Applied and environmental microbiology*, 76(17), 5965-5971.
- Loubet B., Cellier P., Flura D., Genermont S. 1999a. An evaluation of the wind-tunnel technique for estimating ammonia volatilization from land: Part 1. Analysis and improvement of accuracy. *Journal of Agricultural Engineering Research* 72, 71-81.
- Loubet B., Cellier P., Genermont S., Flura D. 1999b. An evaluation of the wind-tunnel technique for estimating ammonia volatilization from land: Part 2. Influence of the tunnel on transfer processes. *Journal of Agricultural Engineering Research* 72, 83-92.
- Lwoff, A., Anderson T.F., et Jacob F. 1959. Remarks on the characteristics of the infectious viral particle. *Ann. Inst. Pasteur.* Vol. 97, p. 281-289.
- Lwoff A. 1953. LYSOGENY . *Bacteriol. Rev.* Vol. 17, n°4, p. 269-337.
- Mara D.D., Sleigh P.A., Blumenthal U.J., Carr R.M. 2007. Health risks in wastewater irrigation: Comparing estimates from quantitative microbial risk analyses and epidemiological studies. *Journal of Water and Health* 5, 39-50.
- Marks P.J., Vipond I.B., Carlisle D., Deakin D., Fey R.E., Caul E.O. 2000. Evidence for airborne transmission of Norwalk-like virus (NLV) in a hotel restaurant. *Epidemiology and Infection* 124, 481-487.
- Marks P.J., Vipond I.B., Regan F.M., Wedgwood K., Fey R.E., Caul E.O. 2003. A school outbreak of Norwalk-like virus: evidence for airborne transmission. *Epidemiology and infection* 131, 727-736.
- Martin L.R., Duke G.M., Osorio J.E., Hall D.J., et Palmenberg A.C.. 1996. Mutational analysis of the mengovirus poly(C) tract and surrounding heteropolymeric sequences. *J. Virol.* Vol. 70, n°3, p. 2027-2031.
- Masclaux F.G., Hotz P., Gashi D., Savova-Bianchi D., Oppliger A. 2014. Assessment of airborne virus contamination in wastewater treatment plants. *Environmental Research* 133, 260-265.
- Matthias-Maser, S., Obolkin V., Khodzer T., et Jaenicke R.. 2000. Seasonal variation of primary biological aerosol particles in the remote continental region of Lake Baikal/Siberia. *Atmos. Environ.* Vol. 34, n°22, p. 3805-3811.
- Mazzini R., Pedrazzi L., et Lazarova V. 2013. Production of high quality recycled water for agricultural irrigation in Milan. Dans : Milest. Water Reuse Best Success Stories.
- Mbithi J.N., Springthorpe, V.S., et Sattar, S.A. 1991. Effect of relative humidity and air temperature on survival of hepatitis A virus on environmental surfaces. *Applied and Environmental Microbiology*, 57(5), 1394-1399.
- McDevitt, J.J., Lai, K.M., Rudnick, S.N., Houseman, E.A., First, M.W., Milton, D.K., 2007. Characterization of UVC Light Sensitivity of Vaccinia Virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 73, 5760-5766. doi:10.1128/AEM.00110-07
- McDevitt, J.J., Rudnick, S.N., Radonovich, L.J., 2012. Aerosol Susceptibility of Influenza Virus to UV-C Light. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1666-1669. doi:10.1128/AEM.06960-11
- Metcalf T.G., Melnick J.L., Estes M.K. 1995. Environmental virology: from detection of virus in sewage and water by isolation to identification by molecular biology-a trip of over 50 years. *Annual Review of Microbiology* 49, 461-87.
- Mik G., De Groot I., Gerbrandy J.L., 1977. Survival of aerosolized bacteriophage phi X174 in air containing ozone--olefin mixtures. *J. Hyg. (Lond.)* 78, 189-198.
- Moe K., et Shirley, J. A. 1982. The effects of relative humidity and temperature on the survival of human rotavirus in faeces. *Archives of virology*, 72(3), 179-186.

- Molle B., Brelle F., Bessy J., et Gatel D.. 2012. Which water quality for which uses? Overcoming over-zealous use of the precautionary principle to reclaim wastewater for appropriate irrigation uses: which reclaimed water quality for which uses in irrigation ? *Irrig. Drain.* Vol. 61, p. 87-94.
- Monnet F., N. Vaillant, A. Hitmi, P. Vernay, A. Coudret, et H. Sallanon. 2002. Treatment of domestic wastewater using the nutrient film technique (NFT) to produce horticultural roses. *Water Res.* Vol. 36, n°14, p. 3489-3496.
- Morris C.E., Leyronas C., et Nicot P. C. 2014. Movement of Bioaerosols in the Atmosphere and the Consequences for Climate and Microbial Evolution. *Aerosol Science: Technology and Applications*, 393-415.
- Nasser A.M., et Oman S.D.. 1999. Quantitative assessment of the inactivation of pathogenic and indicator viruses in natural water sources. *Water Res.* Vol. 33, n°7, p. 1748-1752.
- Nazaroff W.W. 2011. Norovirus, gastroenteritis, and indoor environmental quality. *Indoor Air* 21, 353-356.
- Nenonen N.P., Hannoun C., Svensson L., Torén K., Andersson L.M., Westin J., Bergström T. 2014. Norovirus GII. 4 detection in environmental samples from patient rooms during nosocomial outbreaks. *Journal of Clinical Microbiology* 52, 2352-2358.
- Pachepsky Y., Shelton D.R., McLain J.E.T., Patel J., Mandrell R.E. 2011. Irrigation as a source of pathogenic microorganisms in produce: a review. *Advances in Agronomy* 113 (Chapter two), 73-138.
- Papaiakovou I., Soupilas T., Angelakis A. 2011. Wastewater recycling and reuse for irrigation in EU(REAU) countries: Agricultural and Landscape Cases in Greece & Cyprus. *Water recycling in EUREAU Countries*, Barcelona, Spain, 28 September, 2011
- Paquerot, S. 2007. Ressources en eau : les différentes facettes des conflits internationaux. Disponible sur : < <https://papyrus.bib.umontreal.ca/xmlui/handle/1866/9323> > (Consulté le 22 octobre 2014).
- Paranychianakis N.V., Salgot M., et Angelakis A.N. 2010. Irrigation with Recycled Water: Guidelines and Regulations. Dans : Levy GJ, Fine P, Bar-Tal A (éd.). *Treat. Wastewater Agric.* Oxford, UK : Wiley-Blackwell, p. 77-112.
- Petrinca A.R., Donia D., Pierangeli A., Gabrieli R., Degener A.M., Bonanni E., Diaco L., Cecchini G., Anastasi P., Divizia M. 2009. Presence and environmental circulation of enteric viruses in three different wastewater treatment plants. *Journal of Applied Microbiology* 106, 1608-1617.
- Petterson S.R., Ashbolt N., Sharma A. 2001. Microbial risks from wastewater irrigation of salad crops: A screening-level risk assessment. *Water Environ. Res.* 72, 667-672.
- Phelps D.K., Rossky P.J., Post C.B. 1995. Influence of an antiviral compound on the temperature dependence of viral protein flexibility and packing: a molecular dynamics study. *J Mol Biol* 254, 544-551.
- Pinto R.M., M.I. Costafreda et Bosch A.. 2009. Risk Assessment in Shellfish-Borne Outbreaks of Hepatitis A . *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 75, n°23, p. 7350-7355.
- Pusch D., Oh D.Y., Wolf S., Dumke R., Schröter-Bobsin U., Höhne M., Schreier E. 2005. Detection of enteric viruses and bacterial indicators in German environmental waters. *Archives of virology* 150, 929-947.
- Qadir, M., Bahri A., Sato T., et Al-Karadsheh E. 2010. Wastewater production, treatment, and irrigation in Middle East and North Africa . *Irrig. Drain. Syst.* Vol. 24, n°1, p. 37-51.
- Raschid-Sally L., Jayakody P. 2008. Drivers and characteristics of wastewater agriculture in developing countries: results from a global assessment. *International Water Management Institute (IWMI)*, Research Report 127.
- Renault, P.. 2014. Wastewater quality and required water quality for irrigation purposes. (Climate-KIC).
- Reynolds, K.A., Mena K.D, et Gerba C.P. 2008. Risk of waterborne illness via drinking water in the United States . *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* Vol. 192, p. 117-158.
- Rodríguez-Lázaro D, Cook N., Ruggeri F.M, Sellwood J., Nasser A., Nascimento M.S.J, D'Agostino M., Santos R., Saiz J.C, Rzeżutka A., Bosch A., Gironés R., Carducci A., Muscillo M., Kovač K., Diez-Valcarce M., Vantarakis A., Bonsdorff C-H., Roda Husman A.M., Hernández M., Poel W.H.M. 2012. Virus hazards from food, water and other contaminated environments. *FEMS Microbiology Reviews* 36:786-814.

- Roux J.M., Kaspari O., Grunow R., et Delapierre G.. 2012. Field evaluation of a new high flow rate electrostatic air sampler. Dans : NBC 2012 Symposium on CBRNE Threats. Turku, Finland
- Roux J.M., Kaspari O., Heinrich R., Hanschmann N., et Grunow R.. 2013. Investigation of a New Electrostatic Sampler for Concentrating Biological and Non-Biological Aerosol Particles. *Aerosol Sci. Technol.* Vol. 47, n°5, p. 463-471.
- Rule Wigginton, K., Menin L., Paz Montoya J., et Kohn T.. 2010. Oxidation of Virus Proteins during UV254 and Singlet Oxygen Mediated Inactivation. *Environ. Sci. Technol.* Vol. 44, n°14, p. 5437-5443.
- Salgot M., C. Vergés, et A. N. Angelakis. 2003. Risk assessment in wastewater recycling and reuse. *Water Recycl. Mediterr. Reg.* Vol. 3, n°4, p. 301-309.
- Sánchez-Monedero, M.A., Aguilar M.I., Fenoll R., et Roig A. 2008. Effect of the aeration system on the levels of airborne microorganisms generated at wastewater treatment plants. *Water Res.* Vol. 42, n°14, p. 3739-3744.
- Sano D., Ohta, T., Nakamura A., Nakagomi T., Nakagomi O., et Okabe S. 2015. Culture-Independent Evaluation of Nonenveloped-Virus Infectivity Reduced by Free-Chlorine Disinfection. *Applied and environmental microbiology*, 81(8), 2819-2826.
- Sattar S.A., Lloyd-Evans N., Springthorpe V.S., et Nair, R.C. 1986. Institutional outbreaks of rotavirus diarrhoea: potential role of fomites and environmental surfaces as vehicles for virus transmission. *Journal of hygiene*, 96(02), 277-289.
- Sattar S.A., Ijaz M.K., Johnson-Lussenburg C.M., Springthorpe V.S., 1984. Effect of relative humidity on the airborne survival of rotavirus SA11. *Appl. Environ. Microbiol.* 47, 879-881.
- Scheierling Susanne M., Bartone C.R.D., Mara D., et Drechsel P. 2011. Towards an agenda for improving wastewater use in agriculture . *Water Int.* Vol. 36, n°4, p. 420-440.
- Scherer K., Mäde D., Ellerbroek L., Schulenburg J., Johne R., et Klein, G. 2009. Application of a swab sampling method for the detection of norovirus and rotavirus on artificially contaminated food and environmental surfaces. *Food and Environmental Virology*, 1(1), 42-49.
- Scott C.A., Drechsel P., Raschid-Sally L., Bahri A., Mara D., Redwood M., et Jiménez B. 2010. Wastewater irrigation and health: challenges and outlook for mitigating risks in low-income countries. *Astewater Irrig.* p. 381.
- Scott C.A., Zarazúa J.A., et Levine G. 2000. Urban-wastewater reuse for crop production in the water-short Guanajuato river basin, Mexico. IWMI.
- Sidhu J.P.S., et. Toze S.G. 2009. Human pathogens and their indicators in biosolids: A literature review. *Environ. Int.* Vol. 35, n°1, p. 187-201.
- Shuval H. I., Guttman-Bass N., Applebaum J., et Fattal B. 1989. Aerosolized enteric bacteria and viruses generated by spray irrigation of wastewater. *Water Science & Technology*, 21(3), 131-135.
- Sous-comité fédéral-provincial sur l'eau potable. 1996. Recommandations pour la qualité de l'eau potable au Canada. Ottawa : Santé Canada, ISBN : 0660951436 9780660951430.
- Sou/Dakouré M.Y., Mermoud A., Yacouba H., Boivin P. 2013. Impacts of irrigation with industrial treated wastewater on soil properties. *Geoderma* 200-201:31-39.
- Stellacci P., Liberti, L., Notarnicola M., et Haas C.N. (2010). Hygienic sustainability of site location of wastewater treatment plants: a case study. II. Estimating airborne biological hazard. *Desalination*, 253(1), 106-111.
- Stine S.W., Song I., Choi C.Y., Gerba, C.P. 2005. Application of microbial risk assessment to the development of standards for enteric pathogens in water used to irrigate fresh produce. *J. Food Prot.* 68, 913-918.
- Strazynski M. 2002. Thermal inactivation of poliovirus type 1 in water, milk and yoghurt. *Int. J. Food Microbiol.* Vol. 74, n°1-2, p. 73-78.
- Stine S. W., Song I., Choi C. Y., et Gerba C.P. 2005. Effect of relative humidity on preharvest survival of bacterial and viral pathogens on the surface of cantaloupe, lettuce, and bell peppers. *Journal of Food Protection®*, 68(7), 1352-1358.
- Sultan B., L.K., Guégan J.F., et Janicot S. 2005. Climate Drives the Meningitis Epidemics Onset in West Africa. *PLoS Med.* Vol. 2, n°1, p. e6.

- Symonds E.M., Griffin D.W., et Breitbart M. 2009. Eukaryotic Viruses in Wastewater Samples from the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 75, n°5, p. 1402-1409.
- Syngouna V.I., Chrysikopoulos C.V. 2010. Interaction between viruses and clays in static and dynamic batch systems. *Environmental Science and Technology* 44, 4539-4544.
- Taylor R.G. et al. 2012. Ground water and climate change. *Nature Climate Change*, published online.
- Thurston-Enriquez J.A., Haas C.N., Jacangelo J., et Gerba C.P. 2005. Inactivation of Enteric Adenovirus and Feline Calicivirus by Chlorine Dioxide. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 71, n°6, p. 3100-3105.
- Thurston-Enriquez J.A., Haas C.N., Jacangelo J., Riley K., et Gerba C.P.. 2003. Inactivation of Feline Calicivirus and Adenovirus Type 40 by UV Radiation. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 69, n°1, p. 577 -582.
- Tseng C.-C., Li C.-S., 2006. Ozone for inactivation of aerosolized bacteriophages. *Aerosol Sci. Technol.* 40, 683–689. doi:10.1080/02786820600796590
- Tseng C.C., Li C.S. 2005. Collection efficiencies of aerosol samplers for virus-containing aerosols. *Journal of Aerosol Science* 36, 593-607.
- Tulet P. 2005. ORILAM, a three-moment lognormal aerosol scheme for mesoscale atmospheric model: Online coupling into the Meso-NH-C model and validation on the Escompte campaign. *J. Geophys. Res.*
- Urbanucci A., Myrmet M., Berg I., Von Bonsdorff C. H., et Maunula L. 2009. Potential internalisation of caliciviruses in lettuce. *International journal of food microbiology*, 135(2), 175-178.
- US-EPA/US-AID. 2012. Guidelines for water reuse. US-EPA/US-AID.
- Van den Berg H., Lodder W., van der Poel W., Vennema H., de Roda Husman A.M. 2005. Genetic diversity of noroviruses in raw and treated sewage water. *Research in Microbiology* 156, 532-540.
- Van der Bruggen B. 2010. The global water recycling situation. *Sustainability Science and Engineering*, 2, 41-62.
- Vasickova P., Pavlik I., Verani M., et Carducci A. 2010. Issues concerning survival of viruses on surfaces. *Food and Environmental Virology*, 2(1), 24-34.
- Vaughan G., L. Rossi M.G, Forbi J.C., De Paula V.S., Purdy M.A., Xia G., et Khudyakov Y.E. 2014. Hepatitis A virus: Host interactions, molecular epidemiology and evolution. *Infect. Genet. Evol.* Vol. 21, p. 227-243.
- Vega E., Smith J., Garland J., Matos A., et Pillai S.D. 2005. Variability of virus attachment patterns to butterhead lettuce. *Journal of Food Protection®*, 68(10), 2112-2117.
- Veligura A., Khuler M., Fritzsche W., Scharff P., Risch K., Lytvyn P., Gorchinskyy A., Buzaneva E. 2006. UV-Induced DS (SS)-DNA Damage: Optical and Electrical Recognition. In Proceedings of the NATO Advanced Research Workshop on "Cell Biology and Instrumentation: UV Radiation, Nitric Oxide and Cell Death in Plants" (Y. Blume, D.J. Durzan, P. Smertenko Eds), 371, 109-121.
- Verbyla ME, Mihelcic JR. 2015. A review of virus removal in wastewater treatment pond systems. *Water Research* 71:107–124.
- Verreault D., Moineau S., Duchaine C. 2008. Methods for sampling of airborne viruses. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 72, 413-444.
- Villar L.M., De Paula V.S., Diniz-Mendes L., Guimarães F.R., Ferreira F.F.M., Shubo T.C., Miagostovich M.P., Lampe E., et Gaspar A.M.C.. 2007. Molecular detection of hepatitis A virus in urban sewage in Rio de Janeiro, Brazil. *Lett. Appl. Microbiol.* Vol. 45, n°2, p. 168-173.
- Vogel H., Pauling A., et Vogel B. 2008. Numerical simulation of birch pollen dispersion with an operational weather forecast system. *Int. J. Biometeorol.* Vol. 52, n°8, p. 805-814.
- Vörösmarty C.J., McIntyre P.B., Gessner M.O.D., Dudgeon A., Prusevich P., Green S., Glidden S.E. Bunn C.A., Sullivan C., Reidy Liermann, et P. M. Davies. 2010. Global threats to human water security and river biodiversity. *Nature*. Vol. 467, n°7315, p. 555-561.
- Walker, C.M., Ko, G., 2007. Effect of Ultraviolet Germicidal Irradiation on Viral Aerosols. *Environ. Sci. Technol.* 41, 5460–5465.

- Walter, M.V., Marthi B., Fieland V.P., et Ganio L.M.. 1990. Effect of aerosolization on subsequent bacterial survival. *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 56, n°11, p. 3468-3472.
- Wei J., Jin Y., Sims T., et Kniel, K.E. 2010. Manure-and biosolids-resident murine norovirus 1 attachment to and internalization by Romaine lettuce. *Applied and environmental microbiology*, 76(2), 578-583.
- Wei J., Jin Y., Sims T., Kniel K.E. 2011. Internalization of murine norovirus 1 by *Lactuca sativa* during irrigation. *Applied and Environmental Microbiology* 77, 2508-2512.
- Wéry N., Monteil C., Pourcher A.M., et Godon J.J.. 2010. Human-specific fecal bacteria in wastewater treatment plant effluents . *Water Res.* Vol. 44, n°6, p. 1873-1883.
- West J.S., Kimber R.B.E. 2015. Innovations in air sampling to detect plant pathogens. *Annals of Applied Biology* 166, 4-17.
- WHO 2006. Guidelines for the safe use of wastewater, excreta and greywater. Geneva : WHO (World Health Organization).
- WHO 1989. Guidelines for the safe use of wastewater and excreta in agriculture and aquaculture; measures for public health protection. Geneva : WHO (World Health Organization).
- Zhao Y., Aarnink A. J. A., Wang W., Fabri T., Groot Koerkamp P.W.G., et De Jong M.C.M.. 2014. Airborne virus sampling: Efficiencies of samplers and their detection limits for infectious bursal disease virus (IBDV) . *Ann. Agric. Environ. Med. AAEM.* Vol. 21, n°3, p. 464-471.
- Zhao Y., Aarnink A.J.A., Dijkman R., Fabri T., De Jong, M.C.M., Groot Koerkamp, P.W.G., 2012. Effects of Temperature, Relative Humidity, Absolute Humidity, and Evaporation Potential on Survival of Airborne Gumboro Vaccine Virus. *Appl. Environ. Microbiol.* 78, 1048–1054. doi:10.1128/AEM.06477-11
- Zhang X., S. Sun, Xiang Y., Wong J., Klose T., Raoult D., et Rossmann M.G.. 2012. Structure of Sputnik, a virophage, at 3.5-Å resolution. *Proc. Natl. Acad. Sci.* Vol. 109, n°45, p. 18431-18436.
- Zhuang J., et Jin Y. 2008. Interactions between viruses and goethite during saturated flow: Effects of solution pH, carbonate, and phosphate. *Journal of contaminant hydrology*, 98(1), 15-21.
- Ziros P.G., Kokkinos P.A., Legaki E., Vantarakis A. 2011. Development of an optimized method for the detection of airborne viruses with real-time PCR analysis. *Virology Journal* 8, 369-37